中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 21 卷　第 7 期（总第 210 期）　2023 年 7 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑：中南药学编辑委员会

地址：长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院内

出版：中南药学杂志社

发行：湖南省报刊发行局

印刷：长沙建华印务有限公司

订阅：全国各地邮局

定价：每期 25.00 元，全年 300.00 元

邮编：410011

电话：（0731）82258487/84895602

传真：（0731）82258487

邮发代号：42-290

投稿网址：http://znyx.cbpt.cnki.net

email：znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可证：4300004000764

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2023 年版权归《中南药学》编辑部所有

目　次

代谢组学技术在中药研究领域中的应用

（1693）^{1}H NMR ERETIC2 结合多变量分析法定量分析生麻黄与蜜炙麻黄差异 …… 高建，窦志英，付志飞，等

（1700）基于代谢组学和肠道菌群研究褐藻寡糖对脂多糖诱导的何首乌致大鼠肝损伤的影响 …… 韩春月，任红微，王影，等

（1707）大血藤质子核磁共振指纹图谱研究 …… 裴洁荣，金如意，苏梅，等

（1712）代谢组学在中药作用机制研究中的应用 …… 张雨馨，陈碧莹，王丽明，等

研究论文

（1720）不同程度慢性脑低灌注导致小鼠脑白质损伤和认知功能改变的研究 …… 滕李利，钟奕，戚舜尧，等

（1726）基于非靶向代谢组学的儿童川崎病血浆生物标志物筛选研究 …… 张俊，葛亚文，周霄颖，等

（1733）生理药动学模型预测国产左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性及对体内药动学影响 …… 石笑弋，刘轶，兰文，等

（1738）小儿黄龙颗粒对注意力缺陷多动障碍大鼠的干预作用及机制研究 …… 伍永鸿，刘嘉琦，田骄，等

（1744）卷曲乳杆菌类细菌素的分离纯化及表征 …… 邹达，唐美，黄雄辉，等

（1751）一种禽类动物关节微透析固定装置的设计和应用研究 …… 任志鑫，李耀磊，杨婷，等

（1756）基于 UPLC-Q-TOF-MS “建昌帮”蜜糠炒苍术炮制前后化学成分分析 …… 朱文婷，陆美霞，丁燕，等

（1763）*PD-1/PD-L1/C5ar1* 基因人源化小鼠模型的构建及其在免疫治疗中的应用 …… 井红艳，聂琰晖，于兴艳，等

（1769）18*α*- 甘草次酸的微波辅助合成及工艺优化 …… 戚蕊，薛康，褚福浩，等

（1775）香烟烟雾和白藜芦醇对大鼠血压的影响和机制研究 …… 王婷，陈雨萌，李倩，等

（1781）金嗓散结丸体外溶出行为的研究… 汪海宣，程庆兵，郑正，等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编（按姓氏笔画排列）

王　玉　向大雄　刘　韶　刘芳群
孙国祥　孙铁民　苏薇薇　张毕奎
范国荣　赵志刚　原永芳　潘卫三

编委（按姓氏笔画排列）

丁劲松　于海洋　马恩龙　王　玉
王　珊　王立辉　王永军　王淑梅
王朝辉　文晓柯　方平飞　尹　桃
邓银华　左美玲　左笑丛　卢海儒
史志华　冯　星　边　原　吕永宁
朱运贵　向大雄　刘　韶　刘文虎
刘芳群　刘茂柏　刘建平　刘高峰
刘塔斯　刘雁鸣　汤海峰　孙　进
孙平华　孙国祥　孙铁民　劳海燕
苏薇薇　李　昕　李　勇　李文龙
李文莉　李顺祥　李晓宇　李健和
李湘平　杨志平　杨星钢　杨献文
肖　雪　肖贵南　何　丹　何江江
何鸽飞　余自成　谷福根　张　俐
张　峻　张毕奎　张洪文　陈　力
陈　琦　陈　碧　陈卫东　陈西敬
陈勇川　武新安　范国荣　金鹏飞
周　权　屈　建　孟宪生　赵立波
赵志刚　姜德建　娄月芬　宫　建
祝德秋　秦红岩　袁　成　袁　易
贾素洁　夏道宗　原永芳　徐　珽
徐　萍　徐必学　高利臣　郭　韧
郭怀忠　郭建军　唐　芳　曹　玲
常福厚　巢志茂　彭文兴　董亚琳
董得时　蒋孟良　傅　强　温金华
谢　诚　谢奕丹　睢大贇　肇丽梅
翟　青　黎　敏　颜　苗　潘卫三
魏高文

（1786）基于网络药理学及实验验证探究益肾活血方治疗肾纤维化的作用机制 …… 姚玲，程靖，邱璐琦

（1794）中华眼镜蛇神经毒素相转化水凝胶微针的制备及其初步镇痛作用研究 …… 陈月，许玲玲，葛廷雨，等

（1800）基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的糖尿康胶囊的化学成分分析 …… 胡静，许建秦，陈志永，等

（1809）替比培南匹酯颗粒的制备及体内外评价 …… 赵伟，刘阿利，张贵民，等

（1815）基于 AHP- 模糊数学综合评价枇杷清肺饮矫味工艺 …… 胡泽萍，张福明，高子涵，等

（1820）基于网络药理学和指纹图谱的远志抗抑郁质量标志物的预测 …… 杨素德，吴信华，高洪邺，等

（1827）大蒜素通过抑制内质网应激减轻血管性痴呆大鼠海马神经元损伤 …… 陈晨，孙志涛，张洪峰

（1833）具备“壳 - 核”结构的 pH/GSH 双响应叠层载药胶束递送系统的研究 …… 许小艺，严菲，黄朝瑜，等

（1841）电子束辐照对藏药材力嘎都质量的影响 …… 余杨健，谢和兵，尼玛次仁，等

综述

（1846）“变价”纳米递送系统在肿瘤治疗中的研究进展 …… 金哲妮，程苇钇，何莉，等

（1852）海藻多糖的抗病毒活性及其机制的研究进展 …… 高星熠，张诗悦，张伟，等

（1859）芳香烃受体在类风湿关节炎中作用及机制的研究进展 …… 吕政伟，王宁，龚国清

（1865）EGFR-TKI 与免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌中序贯使用引起毒副反应的研究进展 …… 翟婧，严婷，伍奕，等

（1870）能量色散 X 射线荧光光谱在中药材分析中的研究进展 …… 陈前，李进良，李沛波，等

（1877）改善外泌体应用局限性的研究进展…… 张茜，鲁卫东

（1883）胆固醇结晶相关的疾病以及消除结晶的治疗策略 …… 张杰，杨求胜，彭旭聪，等

（1890）纳米载药技术在几种常见自身免疫性疾病模型中的应用研究进展 …… 罗仁幸，王妍妍，黄功华

（1897）NLRP3 炎症小体在肿瘤中的作用及其抑制剂研究进展 …… 陈秀会，郑裕彤，叶卫军，等

药物分析与检验

（1907）一测多评法同时测定新敷愈散中 6 种成分含量 …… 黄学娣，唐莉华，施林峰，等

青年编委（按姓氏笔画排列）

丁　骁　于世慧　王　刚　王　洪
王春江　方伟进　孔维军　朱志红
刘　宏　刘丽华　刘宏飞　刘剑敏
刘梦扬　孙　逸　孙万阳　孙丙军
孙晓慧　苏　丹　杜恩明　李　娟
李语玲　李新刚　肖朝江　吴成军
邱玉玲　何　艳　邹振兴　张　凭
张妙红　张纯刚　张程亮　陈　倩
陈　璐　陈国宁　陈富超　罗　聪
金　锐　周志旭　赵　亮　赵　娣
胡　楠　姜　雷　贾王平　徐　硕
徐文峰　郭海彪　黄　芳　梅升辉
龚力民　梁光平　寇龙发　蒋跃平
蒋德旗　韩立峰　韩晓芳　韩晓鹏
舒　畅　曾贵荣　蒙光义　廖德华
潘　昊　魏　博

编辑：邬志娟　彭金飞　李　科
陆窈窈

本刊声明：

本刊已入编中国知网等数据库，其收录论文作者著作权使用费与本刊稿酬一并支付。凡不同意编入数据库的稿件，请在来稿时声明。

除非特别声明，本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

（1911）HPLC-DAD 法检测降糖类保健食品中非法添加的二肽基肽酶 -4 抑制剂和钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂
…… 徐硕，徐文峰，邝咏梅，等

（1917）HPLC-DAD 测定止咳平喘类中成药中 12 种化学药物
…… 汤慧，张萍，吴静，等

（1921）电感耦合等离子体质谱法测定盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液中 24 种元素杂质的含量 …… 赵冯，张杞柳，张石楠，等

（1926）基于指纹图谱、含量测定及多元统计分析的银花感冒颗粒质量评价研究 …… 张建平，杨非凡，任杰，等

（1931）基于近红外光谱及图像处理技术的中药化妆品保湿效果评价
…… 郭金玲，甄凯旋，吴晨璐，等

医院药学

（1937）基于 SHEL ＋ Reason 模型的住院药房药品调剂差错安全风险综合评价指标体系的建立 …… 闫岩，吴小曼，张青青，等

（1943）氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重有效性和安全性的 Meta 分析…… 陈仕鹏，曹利娟，李凌松，等

（1950）品管圈在降低高警示药品管理不合格率中的应用研究
…… 路支超，赵如森，徐洪燕，等

（1954）碳青霉烯类的微型卫生技术评估
…… 梁乔芳，姚欣凯，廖小林，等

（1962）口服华法林患者合并疼痛的药学监护路径
…… 秦琼，薛领，谢诚，等

药品不良反应

（1966）基于 FAERS 对 3 种 JAK 抑制剂相关主要心血管不良事件及恶性肿瘤不良事件的真实世界研究 … 舒家华，李国兴，向秋林，等

（1973）呋喃唑酮致急性间质性肺疾病 1 例并文献复习
…… 汪庆路，陈圆圆，陈焕芹，等

（1976）1 例 PD-L1 抑制剂致突眼不良反应分析
…… 周转利，姚霜霜，甄琴，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*286*zh*P*25.0*47*2023-7

本期责任编辑：李科，彭金飞，邬志娟，陆窈窈

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 7 July 20 2023

Consultant
ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief
LI Huan-de

Chief of Editorial Office
ZHANG Bi-kui

Chief of Editorial Department
WU Zhi-juan

Directed by
Food and Drug Administration of Hunan Province

Edited by
Editorial Board of Central South Pharmacy (139 Middle Renmin Road, Changsha, China)

Tel
(0731) 82258487/84895602

Fax
(0731) 82258487

Website of Authors
http://znyx.cbpt.cnki.net

Email
znyxzz2003@vip.163.com

Published by
Central South Pharmacy Publishing House

Advertisement Publishing Certification
4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

(1694) Quantitative analysis of the difference between raw and honey-fried *Ephedra sinica* Stapf by ^{1}H NMR ERETIC2 combined with multivariate analysis ····· *GAO Jian, DOU Zhi-ying, FU Zhi-fei, et al*

(1700) Protective effect of alginate oligosaccharide on live injury induced by Polygoni multiflori radix in lipopolysaccharide activated rats based on gut microbiota and metabonomics
·····*HAN Chun-yue, REN Hong-wei, WANG Ying, et al*

(1707) ^{1}H-NMR fingerprint of Sargentodoxae Caulis
····· *PEI Jie-rong, JIN Ru-yi, SU Mei, et al*

(1712) Role of metabonomics in the active mechanism of traditional Chinese medicine
····· *ZHANG Yu-xin, CHEN Bi-ying, WANG Li-ming, et al*

(1720) Effect of different degrees of chronic cerebral hypoperfusion on white matter lesions and cognitive function changes in mice
····· *TENG Li-li, ZHONG Yi, QI Shun-yao, et al*

(1726) Plasma biomarker screening in pediatric Kawasaki disease based on non-target metabolomics
····· *ZHANG Jun, GE Ya-wen, ZHOU Xiao-ying, et al*

(1733) Dissolution characteristics of domestic levodropropizine capsules in vitro and their influence on pharmacokinetics in vivo by physiolog based pharmacokinetic model
····· *SHI Xiao-yi, LIU Yi, LAN Wen, et al*

(1738) Intervention and mechanism of Xiao'er Huanglong granules on rats with attention deficit hyperactivity disorder
····· *WU Yong-hong, LIU Jia-qi, TIAN Jiao, et al*

(1744) Isolation, purification and characterization of bacteriocin-like substance from *Lactobacillus crispatus*
····· *ZOU Da, TANG Mei, HUANG Xiong-hui, et al*

(1751) Design and application of a microdialysis fixation device in the joints of poultry····· *REN Zhi-xin, LI Yao-lei, YANG Ting, et al*

(1756) Chemical components of fried Atractylodes Rhizoma with honey bran based on UPLC-Q-TOF-MS before and after the processing
····· *ZHU Wen-ting, LU Mei-xia, DING Yan, et al*

(1763) Construction of *PD-1/PD-L1/C5ar1* gene humanized mouse model and its application in immunotherapy
····· *JING Hong-yan, NIE Yan-hui, YU Xing-yan, et al*

(1769) Microwave-assisted synthesis and process optimization of 18*α*-glycyrrhetinic acid ····· *QI Rui, XUE Kang, CHU Fu-hao, et al*

Postal code
42-290

Publish
Editorial Office of Central South Pharmacy

Subscribe
Post office nationwide for subcription please contact the Publishing House of our journal

Price
￥ 25.00 an issue
￥ 300.00 a year

CSSN
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

Copyright 2023 by the Central South Pharmacy

All articles published represent the opinions of the authors, do not reflect the official policy of the Editorial Board, unless this is clearly specified.

(1775) Effect and mechanism of cigarette smoking and resveratrol on blood pressure in rats …… *WANG Ting, CHEN Yu-meng, LI Qian, et al*

(1781) Dissolution behaviors of Jinsang Sanjie pills
…… *WANG Hai-xuan, CHENG Qing-bing, ZHENG Zheng, et al*

(1786) Effect of Yishen Huoxue decoction on renal fibrosis and related mechanism based on network pharmacology and experimental verification
…… *YAO Ling, CHENG Jing, QIU Lu-qi*

(1794) Naja atra neurotoxin phase-transition hydrogel-forming microneedles: preparation and analgesic effect
…… *CHEN Yue, XU Ling-ling, GE Ting-yu, et al*

(1800) Chemical constituents in Tangniaokang capsules based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS …… *HU Jing, XU Jian-qin, CHEN Zhi-yong, et al*

(1809) Preparation and in vitro-in vivo evaluation of tebipenem pivoxil granules
…… *ZHAO Wei, LIU A-li, ZHANG Gui-min, et al*

(1815) Comprehensive evaluation of flavor correction technology of Pipa Qingfei decoction based on AHP-fuzzy mathematics
…… *HU Ze-ping, ZHANG Fu-ming, GAO Zi-han, et al*

(1820) Predictive of *Polygala Tenuifolia* quality markers for antidepressant effect based on network pharmacology and fingerprints
…… *YANG Su-de, WU Xin-hua, GAO Hong-ye, et al*

(1827) A llicin reduce the damage of hippocampal neurons in rats with vascular dementia by inhibiting endoplasmic reticulum stress
…… *CHEN Chen, SUN Zhi-tao, ZHANG Hong-feng*

(1833) pH/GSH dual-response stacked drug delivery system with a "shell-and-core" structure …… *XU Xiao-yi, YAN Fei, HUANG Chao-yu, et al*

(1841) Effect of electron beam irradiation on the quality of Tibetan medicine Ligadu
…… *YU Yang-jian, XIE He-bing, Ni-Ma-Ci-Ren, et al*

(1846) Research progress in valence-variable nano-delivery system in tumor treatment …… *JIN Zhe-ni, CHENG Wei-yi, HE Li, et al*

(1852) Research progress in antiviral activities of seaweed polysaccharides and related mechanism
…… *GAO Xing-yi, ZHANG Shi-yue, ZHANG Wei, et al*

(1859) Research progress in the role and mechanism of aryl hydrocarbon receptor for rheumatoid arthritis
…… *LYU Zheng-wei, WANG Ning, GONG Guo-qing*

(1865) Research progress in the toxicity induced by sequential use of EGFR-TKI and ICIs in non-small cell lung cancer
…… *ZHAI Jing, YAN Ting, WU Yi, et al*

(1870) Research progress of energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy in analysis of Chinese medicinal materials
…… *CHEN Qian, LI Jin-liang, LI Pei-bo, et al*

(1877) Research progress on improving the limitations of exosomess application
…… *ZHANG Qian, LU Wei-dong*

(1883) Cholesterol crystals related diseases and elimination strategies
…… *ZHANG Jie, YANG Qiu-sheng, PENG Xu-cong, et al*

(1890) Research progress in nano-drug loading technology in autoimmune disease models …… *LUO Ren-xing, WANG Yan-yan, HUANG Gong-hua*

(1897) Role of NLRP3 inflammasome in tumors and its inhibitors
…… *CHEN Xiu-hui, ZHENG Yu-tong, YE Wei-jun, et al*

(1907) Simultaneous determination of 6 components in Xinfuyu powder by QAMS
…… *HUANG Xue-di, TANG Li-hua, SHI Lin-feng, et al*

(1912) Determination of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and sodium glucose cotransporter 2 inhibitor illegally added in antidiabetic dietary supplements by HPLC-DAD
…… *XU Shuo, XU Wen-feng, KUANG Yong-mei, et al*

(1917) Determination of 12 illegally added chemical drugs in antitussive Chinese traditional patent medicine by HPLC-DAD
…… *TANG Hui, ZHANG Ping, WU Jing, et al*

(1921) Content determination of 24 element impurities by ICP-MS in levofloxacin hydrochloride and sodium chloride injection
…… *ZHAO Feng, ZHANG Qi-liu, ZHANG Shi-nan, et al*

(1926) Quality evaluation of Yinhua Ganmao granules based on HPLC fingerprints, content determination and multivariate statistical analysis
…… *ZHANG Jian-ping, YANG Fei-fan, REN Jie, et al*

(1931) Moisturizing effect of traditional Chinese medicine cosmetics based on near-infrared spectroscopy and image processing technology
…… *GUO Jin-ling, ZHEN Kai-xuan, WU Chen-lu, et al*

(1937) Safety risk evaluation indicator system for drug dispensing errors in inpatient pharmacy based on SHEL+Reason model
…… *YAN Yan, WU Xiao-man, ZHANG Qing-qing, et al*

(1943) Meta-analysis of the effectiveness and safety of ambroxol combined with acetylcysteine for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease …… *CHEN Shi-peng, CAO Li-juan, LI Ling-song, et al*

(1954) Assessment of carbapenems by Mini health technology assessment
…… *LIANG Qiao-fang, YAO Xin-kai, LIAO Xiao-lin, et al*

(1966) Real-world study of major cardiovascular adverse events and malignancy adverse events associated with 3 JAK inhibitors based on FAERS
…… *SHU Jia-hua, LI Guo-xing, XIANG Qiu-lin, et al*

代谢组学技术在中药研究领域中的应用

【编者按】

随着中药现代化研究进程的不断深入，阐明中药药效物质及作用机制是中药研究必须解决的科学问题，代谢组学是系统生物学的重要组成部分，是研究中药药效物质、作用机制的重要手段。本专题特邀从事中药代谢组学方法开发及基础研究的专家学者，探讨代谢组学技术在中药相关研究及未来应用的展望，旨在增加代谢组学技术的推广应用以及加快中药现代化进程，为创新中药研发及中药大品种二次开发提供参考依据。

【主持人简介】

韩立峰，博士，正高级实验师，博士研究生导师，中国科学院武汉物理与数学研究所博士后，意大利佛罗伦萨大学访问学者。入选“天津市十二五优秀青年教师培养计划”、天津市“131”创新型人才培养工程第二层次、天津市高校“中青年骨干创新人才培养计划”等人才项目。现任天津市中药化学与分析重点实验室副主任，天津市分析测试协会理事、天津色谱研究会理事、中国中医药信息学会 - 科技创新与成果转化分会理事、天津市药理学会网络药理学专业委员会副会长，*Acupuncture and Herbal Medicine*、《中南药学》杂志青年编委等。主持或参与国家自然科学基金、天津市自然科学基金、国家重大新药创制等项目多项；在 SCI 期刊上发表学术论文 40 余篇，申请 / 授权发明专项 10 余项。获得教育部科技进步一等奖、二等奖，中华中医药学会科技进步一等奖等奖项。

^{1}H NMR ERETIC2 结合多变量分析法定量分析生麻黄与蜜炙麻黄差异

高建[1]，窦志英[2]，付志飞[1]，毛睿[3*]（1. 天津市中药化学与分析重点实验室，天津　301617；2. 天津中医药大学，天津　301617；3. 山西中医药大学，山西　晋中　030619）

摘要：目的　利用 ^{1}H NMR ERETIC2 定量方法对 14 个批次的生麻黄和 6 个批次的蜜炙麻黄进行定性和定量分析，并筛选出差异成分，为麻黄质量标准的提升提供科学依据。**方法**　以特征性成分麻黄碱信号强度为优选指标，对提取方法和复溶溶剂进行优化；建立基于 ^{1}H NMR ERETIC2 方法的生麻黄和蜜炙麻黄特征成分绝对定量方法；采用 ^{1}H NMR 谱图结合多变量分析法寻找不同批次生麻黄和蜜炙麻黄潜在的差异成分。**结果**　最佳样品前处理方法为以甲醇为溶剂，物料比为 1∶5（g/mL），超声提取 5 min，氘代甲醇作为复溶溶剂。^{1}H NMR 图谱共鉴定了 11 个化学成分，其中 8 个共有成分被选作定量指标。定量结果显示，生麻黄和蜜炙麻黄中异亮氨酸、蔗糖、葡萄糖和丙氨酸的含量差异有统计学意义（$P < 0.05$）；多元统计分析结果也表明，生麻黄和蜜炙麻黄之间存在明显差异，葡萄糖和蔗糖是主要的差异贡献成分，且在蜜炙麻黄中含量较高，而蜜炙麻黄中丙氨酸和异亮氨酸的含量则明显下降（$P < 0.05$）。**结论**　本研究建立的 ^{1}H NMR ERETIC2 定量方法结合多元统计分析，可筛选出生麻黄和蜜炙麻黄的差异成分，能够有效区分生麻黄和蜜炙麻黄，为后续麻黄质量标准的完善提供了科学依据。

关键词：麻黄；^{1}H NMR ERETIC2；含量测定；多元统计学分析

中图分类号：R927，R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1693-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.001

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No. 81904058）。

作者简介：高建，男，硕士，主要从事药物代谢研究，email：xy1008611y@163.com　*通信作者：毛睿，女，博士，主要从事中药制药工艺及中药药效成分、质量控制研究，email：mr_0517@163.com

Quantitative analysis of the difference between raw and honey-fried *Ephedra sinica* Stapf by ^{1}H NMR ERETIC2 combined with multivariate analysis

GAO Jian[1], DOU Zhi-ying[2], FU Zhi-fei[1], MAO Rui[3*] (1. *Tianjin Key Laboratory of Analytical Chemistry of Traditional Chinese Medicinal*, *Tianjin* 301617; 2. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 3. *Shanxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Jinzhong Shanxi* 030619)

Abstract: Objective To qualitatively and quantitatively analyze 14 batches of raw *Ephedra sinica* (*E. sinica*) Stapf and 6 batches of honey-fried *E. sinica* with ^{1}H NMR ERETIC2, and screen the differential components to provide a scientific basis for the improvement of quality standards of *E. sinica*. **Methods** The extraction method and the redissolve solvent were optimized with the signal intensity of the ephedrine as the index. A strategy for the absolute quantification of the characteristic components of raw and honey-fried *E. sinica* based on the ^{1}H NMR ERETIC2 method was established. ^{1}H NMR spectroscopy together with multivariate analysis was utilized to determine the potential differential components in different batches of raw and honey-fried *E. sinica*. **Results** The best sample preparation method was optimized as follows: methanol as the solvent, the *material-solvent ratio* of 1∶5 (g/mL), ultrasonic extraction for 5 min, and deuterated methanol as the redissolve solvent. Totally 11 components were identified by ^{1}H NMR spectroscopy, 8 of which were common components were selected for quantification indexes. The quantitative analysis showed significant difference ($P < 0.05$) in the content of isoleucine, sucrose, glucose and alanine between the raw and honey-fried *E. sinica*. The multivariate analysis indicated significant difference between the raw and honey-fried *E. sinica*. Glucose and sucrose were both higher in honey-fried *E. sinica*, while the content of alanine and isoleucine was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The quantitative method of ^{1}H NMR ERETIC2 combined with multivariate statistical analysis helps reveal the differential components of raw and honey-fried *E. sinica*, which can effectively distinguish the raw and honey-fried *E. sinica* and provide a scientific basis for the subsequent improvement of quality control of *E. sinica*.

Key words: *Ephedra sinica* Stapf; ^{1}H NMR ERETIC2; content determination; multivariate statistical analysis

麻黄是麻黄科植物草麻黄（*Ephedra sinica* Stapf）、中麻黄（*Ephedra intermedia* Schrenk et C.A. Mey.）或木贼麻黄（*Ephedra equisetina* Bge.）的干燥草质茎，主要分布在中国的东北、华北、西北、云南和西藏等省份。麻黄性温，味辛、微苦，归肺、膀胱经，具有发汗散寒、宣肺平喘、利水消肿的功效[1]。临床常用的麻黄饮片包括生麻黄和蜜炙麻黄，生麻黄善于发汗解表，经蜜炙后发汗力减弱，可发挥润肺止咳的功效。现代药理研究表明，麻黄具有减肥降脂[2-3]、增强运动能力[4-5]和治疗感冒、流感、哮喘及其他呼吸道疾病的疗效[6-9]。

磁共振（NMR）波谱已成为一种常用的代谢物定量分析工具，为检测天然产物提供了较高的特异性和灵敏度[10-11]。基于脉冲长度的浓度测定（pulse length based concentration determination，PULCON）原理的体内浓度测定的电信号参比法（electronic reference to access in vivo concentrations 2，ERETIC2）是一种将检测到已知浓度的目标化合物定义为 ERETIC 参照，无需添加任何内标的新型 NMR 全自动浓度测定技术[12]。本研究首次以 10 mmol•L^{-1} 丙酮的峰面积作为 ERETIC 参照，建立 ^{1}H NMR ERETIC2 的分析方法，通过优化提取条件和复溶溶剂，对 14 个批次的生麻黄和 6 个批次的蜜炙麻黄进行指标成分的同时定性和定量分析，并结合多元统计学分析，对生麻黄和蜜炙麻黄的差异性进行比较，以期为后续麻黄质量标准的提升提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

Bruker Ascend 600 MHz NMR 超导核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；KQ-1000DE 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；BP121S

型天平（德国 Sartorius 公司）；Millipore 纯水器（美国 Millipore）。

1.2　试药

20 个批次的麻黄样品，包括 6 个批次的蜜炙麻黄（HE）和 14 个批次的生麻黄（RE），经天津中医药大学李天祥教授鉴定为麻黄科植物草麻黄（*Ephedra sinica* Stapf）的干燥草质茎，详细信息见表 1。对照品盐酸麻黄碱（批号：171241-201007，纯度：98%）、盐酸伪麻黄碱（批号：171237-200807，纯度：98%）和甲基麻黄碱（批号：171247-200301，纯度：98%）（中国食品药品检定研究院）。丙酮（分析纯，天津市大茂化学试剂厂），磷酸（天津市化学试剂供销公司）。氘代甲醇（99.8%）和重水（99.9%）（Sigma-Aldrich）。

表 1　生麻黄和蜜炙麻黄样本来源

Tab 1　Sample source of raw and honey-fried *Ephedra sinica*

序号	编号	厂家	饮片	批号
1	HE-1	盛实百草	蜜炙麻黄	16090302
2	HE-2	盛实百草	蜜炙麻黄	16090303
3	HE-3	盛实百草	蜜炙麻黄	16090304
4	HE-4	盛实百草	蜜炙麻黄	D160014
5	HE-5	盛实百草	蜜炙麻黄	D1605048
6	HE-7	盛实百草	蜜炙麻黄	1707019
7	RE-1	盛实百草	麻黄	2017053102
8	RE-2	盛实百草	麻黄	1906030
9	RE-3	盛实百草	麻黄	171105
10	RE-4	盛实百草	麻黄	180120
11	RE-5	盛实百草	麻黄	16090301
12	RE-6	盛实百草	麻黄	B170177001
13	RE-7	盛实百草	麻黄	B170248001
14	RE-8	盛实百草	麻黄	B170282001
15	RE-11	盛实百草	麻黄	1706087
16	RE-12	盛实百草	麻黄	1603118
17	RE-14	盛实百草	麻黄	D1707010
18	RE-17	盛实百草	麻黄	18031022
19	RE-18	盛实百草	麻黄	161210
20	RE-19	盛实百草	麻黄	17010207

2　方法

2.1　样品提取条件的优化

2.1.1　提取溶剂的优化　平行称取麻黄粉末（过 65 目筛）4 份，每份约 0.5 g，置于 500 mL 具塞锥形瓶中，分别加入 50 mL 的 1.44% 磷酸溶液、甲醇和 50% 甲醇溶液，称重。超声提取（功率 600 W，频率 50 kHz）20 min，放冷，再称重，补足减少的重量，摇匀并滤过，取续滤液 1 mL，室温下氮气吹干，用相应的氘代试剂复溶，涡旋 5 min，离心 10 min（4 ℃，13 200 g），取上清液 600 μL 离心 10 min（4 ℃，13 200 g）。将上清液转移至 5 mm 的核磁共振管中，分别进行 ^{1}H NMR 分析。

2.1.2　物料比的优化　以不同物料比 [1∶5、1∶10、1∶20 和 1∶30（g/mL）] 加入相应的甲醇溶液作为提取溶剂，称重，超声提取 20 min，放冷，再称重，补足减少的重量，摇匀并滤过，取续滤液 1 mL，室温下氮气吹干，用相应的氘代试剂复溶，涡旋 5 min，离心 10 min（4 ℃，13 200 g），取上清液 600 μL 离心 10 min（4 ℃，13 200 g）。将上清液转移至 5 mm 的核磁共振管中，分别进行 ^{1}H NMR 分析。

2.1.3　提取时间的优化　平行称取麻黄细粉 4 份，每份约 0.5 g，置于 500 mL 具塞锥形瓶中，加入相应的甲醇溶液称重，以不同提取时间（5、10、30 和 60 min）超声提取（功率 600 W，频率 50 kHz），放冷，再称重，补足减少的重量，摇匀并滤过，取续滤液 1 mL，室温下氮气吹干，用相应的氘代试剂复溶，涡旋 5 min，离心 10 min（4 ℃，13 200 g），取上清液 600 μL 离心 10 min（4 ℃，13 200 g）。将上清液转移至 5 mm 的核磁共振管中，分别进行 ^{1}H NMR 分析。

2.2　复溶试剂的优化

平行称取麻黄细粉 4 份，每份约 0.5 g，置于 500 mL 具塞锥形瓶中，分别加入 50 mL 的 1.44% 磷酸溶液，称重，超声提取 20 min，放冷，再称重，用 1.44% 磷酸溶液补足减少的重量，摇匀，滤过，取续滤液。各取 1 mL 提取液，室温下氮气吹干，分别用 1 mL 氘代甲醇、50% 氘代甲醇、重水和氘代磷酸缓冲盐复溶。涡旋 5 min，离心 10 min（4 ℃，13 200 g），取上清液 600 μL 离心 10 min（4 ℃，13 200 g）。将上清液转移至 5 mm 的核磁共振管中，分别进行 ^{1}H NMR 分析。

2.3　NMR 波谱数据采集

核磁共振谱在 Bruker Ascend 600 MHz NMR 超导核磁共振波谱仪上记录，配备了超低温探头，样品温度为 298 K，样品的 ^{1}H NMR 波谱由标准的一维复合脉冲序列（zgpr）记录，通过预饱和方法抑制水峰。预饱和的脉冲强度为 22.78 dB，恢复延迟时间为 2 s，混频时间为 0.2 s。光谱宽度为 10 330 Hz，累积扫描 128 次，数据点为 32 K。此外，弛豫编辑的 Carr-Purcell-Meibom-Gill（CPMG）脉冲序列被用来分析样品的低分子量代谢物，频谱宽度为 12 019.230 Hz，累积扫描 128 次，数据点为 60 K，弛豫延迟 4 s。采用标准化的核磁共振采集参数（NS：128，SW：19.99×10^{-6}，AQ：2.726 s 和 PLW9：46.64 dB）。新模块 ERETIC2 的核磁共振参数与上述内容相同。此外，为了方便信号分配和确认代谢

物，课题组进行了 *J*-resolved spectroscopy（*J*-RES）、^{1}H-^{1}H COSY、TOCSY、HMBC 和 HSQC 实验，二维谱图采集均采用标准脉冲序列。

2.4 数据分析

^{1}H NMR 数据使用 MestReNova 12.0.0（Mestrelab Research S.L.，Coruña，Spain）处理。实验中使用 20 批次麻黄样品的 ^{1}H NMR 数据各 3 份（总共 60 个 ^{1}H NMR 数据）。使用 MetaboAnalyst 5.0（http：//www.metaboanalyst.ca）平台进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）。

3 结果

3.1 提取溶剂的选择

在相同条件下，以麻黄碱的信号强度为优选指标，使用超声提取法，提取时间为 20 min，分别考察了水、甲醇和 50% 甲醇溶液作为提取溶剂时对提取效果的影响，结果如图 1A 所示。甲醇作为提取溶剂时，麻黄碱信号强度更高且峰形更好，故选用甲醇作为后续麻黄样品的提取溶剂。

3.2 物料比的选择

在相同条件下，以甲醇为提取溶剂，超声提取 20 min，分别考察了物料比 1∶5、1∶10、1∶20 和 1∶30，以麻黄碱信号强度为考察指标，选择最佳物料比。结果如图 1B 所示。当物料比为 1∶5 时，麻黄碱的信号强度最高，选用物料比为 1∶5 作为后续麻黄样品的提取条件。

3.3 提取时间的选择

在相同条件下，以甲醇为提取溶剂，物料比为 1∶5，超声提取，分别考察了提取时间 5、10、30 和 60 min，以麻黄碱信号强度为考察指标，选择最佳提取时间。结果如图 1C 所示，随着提取时间增加，麻黄碱的信号强度未出现明显变化，因此选取 5 min 作为最佳提取时间。

3.4 复溶溶剂的选择

结果如图 1D 所示。当用氘代甲醇复溶时，麻黄碱的信号强度最高，以此作为后续麻黄样品的复溶试剂。

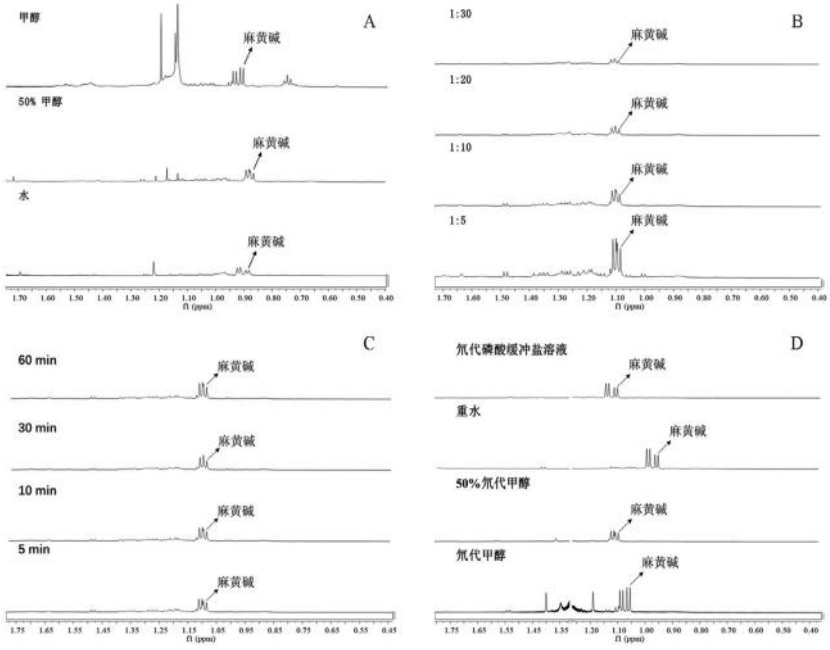


图 1 麻黄样品提取条件优化

Fig 1 Optimization of extraction conditions for *Ephedra sinica* samples

A. 提取溶剂（extraction solvent）；B. 物料比（material-solvent ratio）；C. 提取时间（extraction time）；D. 复溶试剂（reagents for re-solubilization）

3.5 麻黄中成分的鉴定

将制备好的麻黄样品进行 ^{1}H NMR 分析，共鉴定出 11 个化学成分，结果如图 2 和表 2 所示，这些成分包括麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱、异亮氨酸、阿拉伯糖、蔗糖、葡萄糖、丙氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和琥珀酸[13-17]。其中共有成分包括麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱、丙氨酸、琥珀酸、葡萄糖、异亮氨酸和蔗糖作为后续定量指标。

3.6 方法学考察

《中国药典》以盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱为指标成分进行鉴别和含量测定，本研究主要针对麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻黄碱进行了方法学考察。

3.6.1 专属性考察 如图 3 所示，丙酮（10 mmol·L^{-1}）被用作校准标准，样品中各成分不受丙酮信号影响，专属性良好。

3.6.2 精密度和稳定性 麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻

表 2　化学成分的鉴定

Tab 2　Identification of chemical constituents

序号	成分	δ ^{1}H
1	麻黄碱	1.06（d，6.8），1.29（s），1.34（s），2.77（s），3.42（dd），5.09（d，3.1），7.31（dt），7.4（m）
2	伪麻黄碱	1.08（d，6.76），1.29（s），1.34（s），2.72（s），3.35（dd），4.52（d，9.16），7.36（dt），7.4（m）
3	甲基麻黄碱	1.13（d，7.0），1.29（s），1.34（s），3.0（s），3.48（dd），5.29（d，2.86），7.31（dt），7.40（m）
4	异亮氨酸	3.66（d，1.8），1.25（m）
5	阿拉伯糖	3.90（m），3.48（m）
6	蔗糖	5.39（d，3.8），3.53（m），3.77（m）
7	葡萄糖	5.10（d，3.8），4.47（d，7.8），3.12（dd，9.2，7.8）
8	丙氨酸	1.46（d，7.2）
9	精氨酸	1.61（m），1.91（m）
10	谷氨酰胺	2.09（m），2.29（m），3.57（t）
11	琥珀酸	2.50（s）

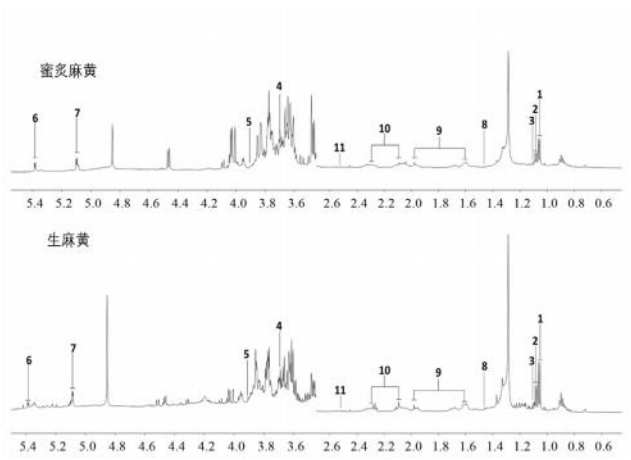


图 2　生麻黄和蜜炙麻黄样品的 ^{1}H NMR 谱图

Fig 2　^{1}H NMR spectra of raw and honey-fried *Ephedra sinica* samples

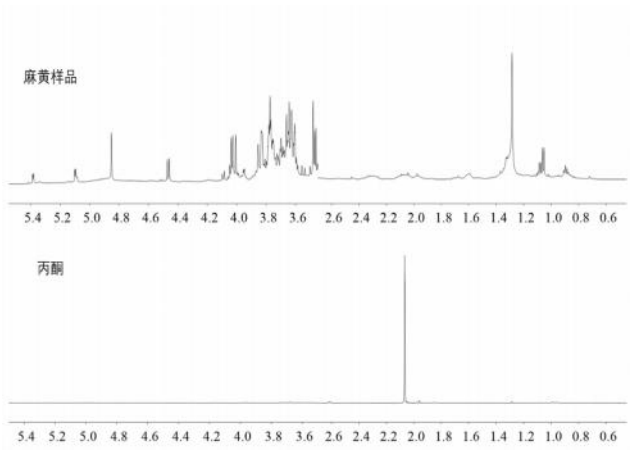


图 3　方法专属性考察

Fig 3　Specificity test

黄碱进行的精密度测试结果显示，日内 *RSD* 为 1.2%、0.28% 和 6.9%。在 5 d 的时间内，每隔 12 h 对同一标准混合溶液进行分析，对方法的稳定性进行评估，采集了 10 次，结果麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻黄碱的 *RSD* 分别为 0.58%、0.99%、2.9%。这表明 ^{1}H NMR ERETIC2 方法具有良好的精密度和稳定性。

3.6.3　重复性　平行制备 6 份麻黄供试样品进行含量测定，结果显示麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻黄碱含量的 *RSD* 分别为 0.58%、0.99%、4.4%，表明 ^{1}H NMR ERETIC2 方法的重复性良好。

3.6.4　回收率　采用标准添加法对麻黄样品中测试的生物碱的提取效率进行了评估，即回收率。将适量的 3 种参比生物碱加入到准确称量的麻黄细粉中，对混合物进行提取和分析。用同样的方法提取适量的麻黄细粉（未加入参比生物碱），制备对照溶液，比较加标溶液中 3 种生物碱的浓度与对照溶液中的浓度来确定回收率。结果显示麻黄碱的回收率为 97.54%、伪麻黄碱为 97.34%、甲基麻黄碱为 89.94%，*RSD* 分别为 1.9%、0.96%、1.6%，表明方法回收率良好。

3.7　麻黄样本中共有成分的定量

选取 20 个批次的麻黄样本中 8 个共有成分进行进一步的定量分析，10 μL 丙酮（10 mmol•L^{-1}）的峰面积作为 ERETIC2 参照，定量结果如表 3 所示。目标化合物的含量通过以下公式计算：

$$C = [(nA \times 10)/N] \times MW$$

n：目标化合物分子式中氢的个数与丙酮分子式中氢个数的比值；A：目标化合物与丙酮峰面积的比值；N：目标化合物分子式中氢的个数；MW：目标化合物的分子量。

定量结果显示，生麻黄经过蜂蜜炮制之后，麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱和琥珀酸的含量差异无统计学意义（$P > 0.05$），而蔗糖、葡萄糖、丙氨酸和异亮氨酸的差异有统计学意义（$P < 0.05$），其中蔗糖和葡萄糖在蜜炙麻黄样品中显著升高，而丙氨酸和异亮氨酸的含量在蜜炙之后显著下降。

3.8　多元统计学分析

PCA 是一种无监督学习方法，它不需要样本来自不同治疗组或具有表型差异的情况下进行分析 [18]，利用主成分分析可视化样本间的分组趋势以及组内样品的离散程度。将不同批次的蜜炙麻黄和生麻黄中共有成分的核磁定量数据进行 PCA 分析，结果见图 4A，该模型在两组之间显示出明显的分离趋势，生麻黄和炮制麻黄的样品聚集良好。从图中可以看出，炮制后的麻黄能更好地聚集在一起，这应该是因为炮制后的药材性质变得稳定。图 4C 以热图的形式显示共有成分含量的变化。其中，与生麻黄相比，蜜炙麻黄样品中葡萄糖和蔗糖含量明显升高，丙氨酸和异亮氨酸的含量则明显下降。VIP 得分（见图 4B）也表明葡萄糖和蔗糖是主要的分类成分。

表 3 20 个批次麻黄中共有成分的定量结果 (mg・g^{-1})

Tab 3 Quantitation of common components in 20 batches of *Ephedra sinica* (mg・g^{-1})

序号	名称	批次	麻黄碱	伪麻黄碱	甲基麻黄碱	丙氨酸*	琥珀酸	葡萄糖*	异亮氨酸*	蔗糖*
1	HE-1	16090302	11.56	6.03	0.59	0.16	1.58	18.91	0.20	3.56
2	HE-2	16090303	11.62	5.92	1.27	0.06	2.53	22.81	0.16	10.87
3	HE-3	16090304	10.98	6.06	1.63	0.09	3.66	21.64	0.12	9.10
4	HE-4	D160014	10.68	7.35	1.14	0.27	0.60	24.63	0.15	2.60
5	HE-5	D1605048	9.91	8.56	1.02	0.08	1.48	26.83	0.07	2.54
6	HE-7	1707019	12.61	6.29	0.96	0.32	0.39	19.33	0.19	0.19
7	RE-1	2017053102	12.22	7.12	1.18	0.43	1.02	2.68	1.28	3.50
8	RE-2	1906030	11.93	7.37	1.46	0.55	1.61	4.19	1.44	1.62
9	RE-3	171105	8.86	3.71	0.96	0.46	0.55	1.79	1.83	0.68
10	RE-4	180120	10.75	4.99	1.49	0.65	1.82	2.10	1.17	1.50
11	RE-5	16090301	10.43	5.32	1.17	0.36	1.23	2.58	1.26	2.77
12	RE-6	B170177001	12.59	9.02	1.49	0.45	2.29	6.64	1.16	2.70
13	RE-7	B170248001	14.40	7.76	1.83	0.65	2.42	4.43	1.15	0.29
14	RE-8	B170282001	9.94	6.27	0.96	0.25	0.48	2.13	1.04	0.52
15	RE-11	1706087	14.92	7.99	2.04	0.55	1.22	6.56	1.21	2.08
16	RE-12	1603118	10.61	6.50	1.15	0.38	1.02	2.29	1.09	0.46
17	RE-14	D1707010	14.95	7.87	2.03	0.87	1.23	4.54	1.29	0.28
18	RE-17	18031022	1.84	6.65	0.81	0.37	1.00	2.18	1.06	1.14
19	RE-18	161210	12.24	8.07	2.02	0.50	1.17	5.48	1.23	0.10
20	RE-19	17010207	11.87	4.71	0.96	0.59	0.94	1.83	1.15	0.45

注：生麻黄和蜜炙麻黄共有成分的定量结果比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Quantitation of common components of raw and honey-fried *Ephedra sinica*，$^{*}P < 0.05$.

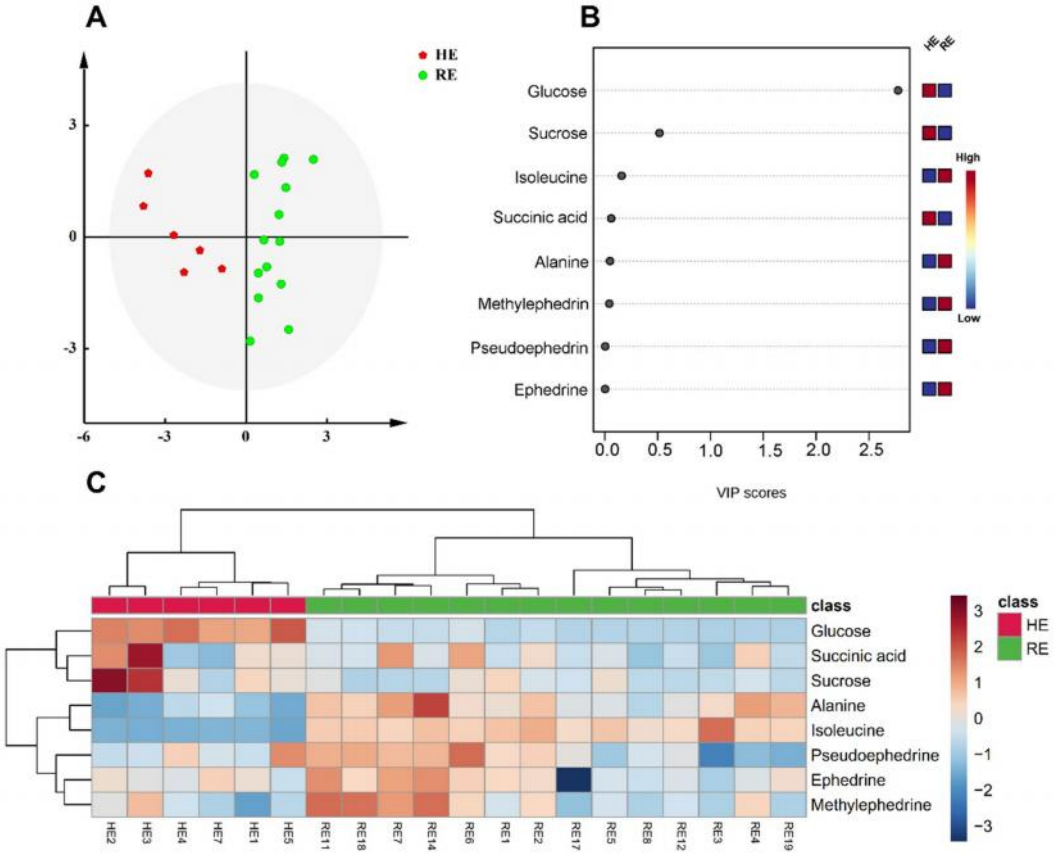


图 4 基于 ^{1}H NMR 数据的多元统计分析

Fig 4 Multivariate statistical analysis based on ^{1}H NMR data

A. 主成分分析（principal component analysis）；B.8 种共有成分的含量变化（variation in content levels of the 8 common components）；C. 变量得分图（scores of variable important in projection）

4　小结

本研究建立了 ERETIC2 的外部校准对绝对强度的 ^{1}H NMR 方法对不同批次的生麻黄和蜜炙麻黄进行了定性和定量研究，共鉴定出 11 个成分。共有成分定量结果表明生麻黄和蜜炙麻黄中蔗糖、葡萄糖、丙氨酸和异亮氨酸的差异有统计学意义，多元统计学结果表明葡萄糖和蔗糖是主要的分类成分，且在蜜炙麻黄中含量较高，为后续麻黄质量标准的完善提供了参考。同时，本研究所建立的 ERETIC2 的外部校准对绝对强度的 ^{1}H NMR 定量方法，可以在缺乏对照品的情况下，实现令人满意的麻黄样品的定量结果。

参考文献

[1] 廖芳，张丹，兰明辉，等 . 探析不同炮制方法对麻黄主要功效影响的机理 [J]. 西部中医药，2015，28（8）：12-15.

[2] Lim J，Lee H，Ahn J，et al. The polyherbal drug GGEx18 from *Laminaria japonica*，*Rheum palmatum*，and *Ephedra sinica* inhibits hepatic steatosis and fibroinflammtion in high-fat diet-induced obese mice [J]. J Ethnopharmacol，2018，225：31-41.

[3] Go RE，Hwang KA，Kim SH，et al. Effects of anti-obesity drugs，phentermine and mahuang，on the behavioral patterns in Sprague-Dawley rat model [J]. Lab Anim Res，2014，30（2）：73-78.

[4] Van Thuyne W，Van Eenoo P，Delbeke F. Nutritional supplements：prevalence of use and contamination with doping agents [J]. Nutr Res Rev，2006，19（1）：147-158.

[5] Lee Se，Lim C，Lim S，et al. Effect of Ephedrae herba methanol extract on high-fat diet-induced hyperlipidaemic mice [J]. Parm Biol，2019，57（1）：676-683.

[6] Gul R，Jan SU，Ahmad M，et al. Formulations，characterization，in vitro and ex vivo release of Ephedra extract from topical preparations using dialysis cellulose membrane and natural rabbit skin [J]. Dissolution Technol，2017，24（4）：24-30.

[7] Mei J，Zhou YT，Yang XP，et al. Active components in *Ephedra sinica* stapf disrupt the interaction between ACE2 and SARS-CoV-2 RBD：potent COVID-19 therapeutic agents [J]. J Ethnopharmacol，2021，278：114303.

[8] Mei F，Xing XF，Tang QF，et al. Antipyretic and anti-asthmatic activities of traditional Chinese herb-pairs，Ephedra and Gypsum [J]. Chin J Integr Med，2016，22（6）：445-450.

[9] Ghavam M，Soleimannejad Z. An overview of the various uses of *Ephedra distachya* L. from the past to the present [J]. Avicenna J Pharm Res，2020，1（2）：82-86.

[10] Balakshin M，Capanema E，Gracz H，et al. Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy [J]. Planta，2011，233（6）：1097-1110.

[11] Caligiani A，Acquotti D，Palla G，et al. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^{1}H NMR spectroscopy [J]. Anal Chim Acta，2007，585（1）：110-119.

[12] Hsieh LY，Chan HH，Kuo PC，et al. A feasible and practical ^{1}H NMR analytical method for the quality control and quantification of bioactive principles in Lycii Fructus [J]. J Food Drug Anal，2018，26（3）：1105-1112.

[13] Xie QL，Gong LM，Huang FB，et al. A rapid and accurate ^{1}H NMR method for the identification and quantification of major constituents in Qishen Yiqi Dripping Pills [J]. J AOAC Int，2021，104（2）：506-514.

[14] Dai H，Xiao CN，Liu HB，et al. Combined NMR and LC-DAD-MS analysis reveals comprehensive metabonomic variations for three phenotypic cultivars of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge [J]. J Proteome Res，2010，9（3）：1565-1578.

[15] Kim HK，Choi YH，Erkelens C，et al. Metabolic fingerprinting of Ephedra species using ^{1}H-NMR spectroscopy and principal component analysis [J]. Chem Pharm Bull，2005，53（1）：105-109.

[16] Ramos AS，Mar JM，da Silva LS，et al. Pedra-ume caá fruit：an amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties [J]. Food Res Int，2019，123：674-683.

[17] 赵巍 . 草麻黄化学成分研究 [D]. 北京：中国协和医科大学，2009.

[18] Lever J，Krzywinski M，Altman N. Points of significance：principal component analysis [J]. Nat Meth，2017，14：641-643.

（收稿日期：2022-12-05；修回日期：2023-01-02）

基于代谢组学和肠道菌群研究褐藻寡糖对脂多糖诱导的何首乌致大鼠肝损伤的影响

韩春月[1, 2]，任红微[1]，王影[1, 2]，刘二伟[1, 2]，付志飞[1, 2*]（1. 天津中医药大学，天津 301617；2. 组分中药国家重点实验室，天津 301617）

摘要：目的 利用代谢组学和肠道菌群技术研究褐藻寡糖对脂多糖诱导的何首乌致大鼠特异质肝损伤的保护作用。**方法** SD 大鼠随机分为正常组、脂多糖组、何首乌组、褐藻寡糖组、脂多糖＋何首乌组、褐藻寡糖＋脂多糖＋何首乌组，按对应剂量灌胃给药。采用基于 ^{1}H-NMR 和 UHPLC-MS 的非靶向代谢组学技术及 16s rDNA 测序技术研究褐藻寡糖对肝损伤大鼠的肝脏代谢物及肠道菌群的影响，并采用多元统计分析的方法，通过变量投影重要性值和 *t* 检验结果来筛选差异代谢物，利用 MetaboAnalyst 5.0 平台分析差异代谢物的代谢通路。**结果** 褐藻寡糖明显减轻何首乌所致的大鼠肝损伤，仅可见轻度炎细胞浸润，散在肝细胞坏死，能显著改变何首乌诱导的肝损伤大鼠肠道菌群和内源性代谢物。**结论** 褐藻寡糖对何首乌联合脂多糖诱导的肝损伤具有保护作用，可能是通过影响肠道菌群进而影响体内一些代谢物发挥保护作用的。

关键词：褐藻寡糖；何首乌；肝损伤；肠道菌群；代谢组学
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1700-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.002

Protective effect of alginate oligosaccharide on live injury induced by Polygoni multiflori radix in lipopolysaccharide activated rats based on gut microbiota and metabonomics

HAN Chun-yue[1, 2], REN Hong-wei[1], WANG Ying[1, 2], LIU Er-wei[1, 2], FU Zhi-fei[1, 2*] (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin* 301617; 2. *State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To determine the protective effect of alginate oligosaccharide on Polygoni multiflori radix (PM)-induced idiosyncratic hepatotoxicity based on gut microbiota and metabonomics. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group, an LPS group, a PM ethanol extraction group (PM), an alginate oligosaccharide group (AOS), an LPS ＋ PM group and an AOS ＋ LPS ＋ PM group. The untargeted metabolomic approach was used to determine the protective effect of AOS on the rat liver. ^{1}H-NMR and UHPLC-MS technology, as well as 16s rDNA sequencing technology were used. Multivariate analysis was used to screen differential metabolites. The metabolic pathways of differential metabolites were analyzed by MetaboAnalyst 5.0 platform. **Results** PM-induced idiosyncratic liver injury was obviously decreased, and the liver pathological injury was reduced after giving alginate oligosaccharide. **Conclusion** Alginate oligosaccharide can protect against liver damage induced by combined Polygoni multiflori radix with LPS, whose mechanism might be through regulating the gut microbiota imbalance and affecting some endogenous metabolites.

Key words: alginate oligosaccharide; Polygoni multiflori radix; live injury; gut microbiota; metabonomics

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No. 81904058）。

作者简介：韩春月，女，硕士，主要从事中药多糖方面的研究，email：hanchunyue1995@163.com *通信作者：付志飞，女，助理研究员，主要从事中药多糖方面的研究，email：fuzhifei@tjutcm.edu.cn

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根，2020 年版《中国药典》记载有生首乌和制首乌之分。制首乌为临床常用补益中药，具有补肝肾、益精血、乌须发之功效[1]。近年来，关于何首乌及其制剂的临床肝损伤不良反应时有报道，影响其使用。文献报道，何首乌肝损伤为特异质肝损伤类型[2]，因此本研究通过尾静脉注射脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导特异质肝损伤模型评价何首乌肝损伤特点。

褐藻寡糖是褐藻多糖褐藻胶降解后的产物，为一种酸性寡糖，具有抗氧化[3]、抗炎[4]、免疫调节[5]等多种活性，但其作用机制仍不明确。褐藻寡糖可促进肠道有益菌的生长，抑制肠道有害菌的生长[6-7]。代谢组学可全面反映机体内生物化学过程和状态的变化，作为新兴的分析技术，在研究内源性代谢物的整体变化规律上具有独特优势[8]。因此，本研究分别利用核磁共振技术（^{1}H-NMR）和超高效液相 - 质谱（UHPLC-MS）技术测定 LPS 诱导的何首乌致肝损伤大鼠肝脏代谢组学的变化，并结合肠道菌群分析探讨褐藻寡糖对肝损伤大鼠的保护作用。

1　材料

1.1　动物

SPF 级 SD 大鼠，体质量（200±20）g [北京市维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2014-0004]。

1.2　试药

制何首乌（安国圣安药业有限公司，No. PMR-20160432），制何首乌 60% 乙醇提取物（PM，实验室自制，含有游离蒽醌类及二苯乙烯苷类等化学成分），褐藻寡糖（AOS，MW ＝ 1.86 kDa，M/G ＝ 0.5，青岛博智汇力科技有限公司），LPS（Sigma 公司），甲醇、乙腈均为色谱纯（Thermo Fisher 公司），超纯水由 Milli-Q 超纯水机（美国 Millipore）制备，其余试剂均为分析纯。

1.3　仪器

Bruker Ascend 600 MHz 高分辨核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；Q-Exactive Orbitrap 四极杆 - 静电场轨道阱质谱仪 [配有热喷雾离子源（HESI）、Xcalibur 4.1 化学工作站]、Ultimate 3000 超高效液相色谱仪（美国 Thermo Scientific 公司）；AX 205 型十万分之一天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

2　方法

2.1　分组、造模及给药

将 48 只 SD 大鼠随机分为 6 组，每组 8 只，分别为正常组（Control 组）、褐藻寡糖组（AOS 组）、LPS 组、何首乌组（PM 组）、脂多糖＋何首乌组（LPS ＋ PM 组），褐藻寡糖＋脂多糖＋何首乌组（AOS ＋ LPS ＋ PM 组）。Control 组给予正常饮食及灌胃等体积的生理盐水 2 周，其他组给药：AOS 组（连续灌胃 AOS 600 mg • kg^{-1} 2 周），LPS 组（尾静脉注射 LPS 溶液 25 μg • kg^{-1}），PM 组（灌胃 PM 10 g • kg^{-1}），LPS ＋ PM 组（尾静脉注射 LPS 溶液 25 μg • kg^{-1}，2 h 后灌胃 PM 10 g • kg^{-1}），AOS ＋ LPS ＋ PM 组（连续灌胃 AOS 600 mg • kg^{-1} 2 周，尾静脉注射 LPS 溶液 25 μg • kg^{-1}，2 h 后灌胃 PM 10 g • kg^{-1}），5 h 后，腹主动脉取血，离心，收集血清，肝组织经生理盐水冲洗后在液氮中速冻，－80 ℃冰箱保存。

2.2　肠道微生物测序分析

微生物多样性是基于 Illumina HiSeq 测序平台，利用双末端测序的方法，构建小片段文库进行测序。本研究对 Reads 进行拼接过滤，对 OTUs（Operational Taxonomic Units）聚类，并进行物种注释及丰度分析，揭示样品的物种构成；进一步进行 α 多样性分析（Alpha Diversity）、β 多样性分析（Beta Diversity）和显著物种差异分析等，挖掘褐藻寡糖对肠道菌群的影响。

2.2.1　DNA 提取与建库测序　采用 Qiagen DNA 提取试剂盒（QIAamp DNA Stool Mini Kit）提取大鼠粪便 DNA；采用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测提取的 DNA 浓度和纯度，采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。提取样品总 DNA 后，利用通用引物 338F 和 806R，扩增 16S rRNA 的 V3 ～ V4 区，产物经纯化、定量和均一化形成测序文库，文库质检，合格的用 Illumina HiSeq 2500 进行测序，得到的原始数据经碱基识别分析转化为原始测序序列，结果以 FASTQ 文件格式存储。

2.2.2　信息分析　利用 QIIME2 软件对测序数据进行处理，首先去除原始序列中的标签与引物序列，然后对原始序列进行质控、去噪、拼接和去除嵌合体，得到有效数据。然后基于有效数据进行 OTUs（Operational Taxonomic Units）聚类和物种分类分析。根据 OTUs 聚类结果，对比 Silva 数据库进行物种注释，然后进行 OTUs、多样性及差异性等分析，利用 R 语言工具进行作图。

2.3　基于 ^{1}H-NMR 的肝脏代谢组学分析

2.3.1　样本预处理　取 0.5 g 的肝脏组织，加入

1 mL 生理盐水，匀浆，取 200 μL 于 1.5 mL 离心管中，加 400 μL 磷酸盐缓冲液 [0.2 mol • L^{-1} KH_2PO_4，0.2 mol•L^{-1} NaH_2PO_4，0.6 mmol•L^{-1} 2，2，3，3，-d_4-3（三甲基硅基）丙酸钠盐（TSP），pH 7.4]，14 000 r • min^{-1}，4 ℃ 离心 10 min，取上清液 550 μL 于核磁管中。

2.3.2 检测条件 使用高分辨核磁共振谱仪，采用 NOESYGPPR-1D（RD-90°-t1-tm-90°-acq）脉冲序列，超低温探头进行氢谱检测，频率为 600.58 MHz，温度为 294 K，谱宽为 9615.4 Hz。

2.3.3 数据处理 所有 ^{1}H-NMR 谱均经傅里叶变换、相位和基线调整，使用 MestReNova 核磁图谱处理软件依据 TSP 信号（δ_H 0.00）对谱图进行化学位移校正，对总峰面积的数据进行归一化，将数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 软件，进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA），根据变量投影重要性（VIP）值＞ 1 和 t 检验（P ＜ 0.05）筛选差异代谢物。

2.4 基于 UHPLC-MS 的肝脏代谢组学分析

2.4.1 样本预处理 取肝脏组织匀浆液 100 μL 于 1.5 mL 离心管中，加入 600 μL 乙腈，4 ℃、13 200 g 离心 10 min，取上清液，氮吹干。分析前用 80% 甲醇水溶液复溶，4 ℃、13 200 g 离心 10 min，取上清液进样。

2.4.2 检测条件

① 色谱条件 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm，美国 Waters 公司）；流动相 A：水（含 0.1% 甲酸），流动相 B：乙腈；洗脱梯度（0 ～ 10 min，3% ～ 100%B）；流速 0.4 mL • min^{-1}；进样量 2 μL；柱温 30 ℃。

② 质谱条件 离子源：HESI 源，正负离子模式；扫描模式：Full-MS/dd-MS^2 模式；源参数：源喷雾电压：正负离子分别为 3.5 kV 和 2.8 kV；毛细管温度为 320 ℃，离子源加热温度为 350 ℃；鞘气（N_2）为 35；辅气（N_2）为 10；S-lens 水平为 50 V；碰撞能量为 20 V，40 V，60 V；扫描范围为 m/z 100 ～ 1500；分辨率为 70 000。

2.4.3 数据处理 将代谢物数据导入 SIMCA-P 14.1 软件进行 PCA 和 OPLS-DA，根据 VIP ＞ 1 和 t 检验（P ＜ 0.05）筛选差异代谢物。将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 数据库进行相关代谢通路分析。

3 结果

3.1 动物一般情况及肝脏形态学观察

大鼠在给予何首乌醇提物后 1 ～ 3 h 内出现轻微腹泻现象，尿液颜色加深；尾静脉注射 LPS 后，出现排便增多现象；其中 LPS ＋ PM 组大鼠出现大便稀溏，AOS ＋ LPS ＋ PM 组大鼠排便量略有增加，大便质地改变不明显，尿液颜色趋于正常。

实验室前期研究结果表明，LPS 可致 SD 大鼠肝细胞部分区域轻度变性及炎细胞浸润，PM 可加重这种现象，导致大部分区域肝细胞变性，提前给予 AOS 干预后，肝损伤明显减轻，仅可见轻度炎细胞浸润，散在肝细胞坏死 [9]。

3.2 肠道菌群的变化

3.2.1 肠道菌群 α 多样性和 β 多样性分析 α 多样性分析显示（见图 1A ～ E），与 Control 组相比，LPS 显著升高 Observed species 指数、Ace 指数、Chao 1 指数（P ＜ 0.05），LPS 虽然是注射给药，但是仍提高了 SD 大鼠肠道菌群多样性；PM 对肠道菌群多样性影响不大；AOS 对 Observed species 指数、Shannon 指数、Ace 指数、Chao 1 指数也均有显著升高作用（P ＜ 0.05），但 LPS ＋ PM 对肠道菌群的多样性影响不大；与 LPS ＋ PM 组相比，AOS ＋ LPS ＋ PM 可显著升高 Observed species 指数、Shannon 指数和 Chao 1 指数，这与 AOS 对肠道菌群影响趋势一致。

β 多样性分析显示（见图 1F），Control 组、LPS 组、AOS 组、LPS ＋ PM 组 和 AOS ＋ LPS ＋ PM 组组内离散程度差异小于组间差异，各组间分离度较好。

3.2.2 肠道菌群组成变化分析 实验结果显示，在门水平上（见图 2A），各组菌群均以拟杆菌门（Bacteroidetes）和厚壁菌门（Firmicutes）为主，与 Control 组相比，LPS 组大鼠变形菌门（Proteobacteria）和放线菌门（Actinobacteria）丰度显著提高；与肠道菌群多样性结果一致，PM 单独给药未显著改变大鼠菌群组成；AOS 单独给药显著提高疣微菌门（Verrucomicrobia）、放线菌门和蓝细菌门（Cyanobacteria）细菌丰度；与 LPS 组相比，LPS ＋ PM 组大鼠放线菌门丰度显著升高，蓝细菌（Cyanobacteria）丰度显著降低；与 LPS ＋ PM 组相比，AOS ＋ LPS ＋ PM 组大鼠疣微菌门丰度显著提高。

在科水平上（见图 2B），与 Control 组相比，LPS 组大鼠肠杆菌科（Enterobacteriaceae）丰度显著提高；与门水平一样，PM 单独给药未显著改变大鼠菌群水平，而 AOS 可显著提高疣微菌科（Verrucomicrobiaceae）和肠杆菌科细菌丰度；与 LPS 组相比，LPS ＋ PM 组大鼠肠球菌科（Enterococcaceae）丰度显著升

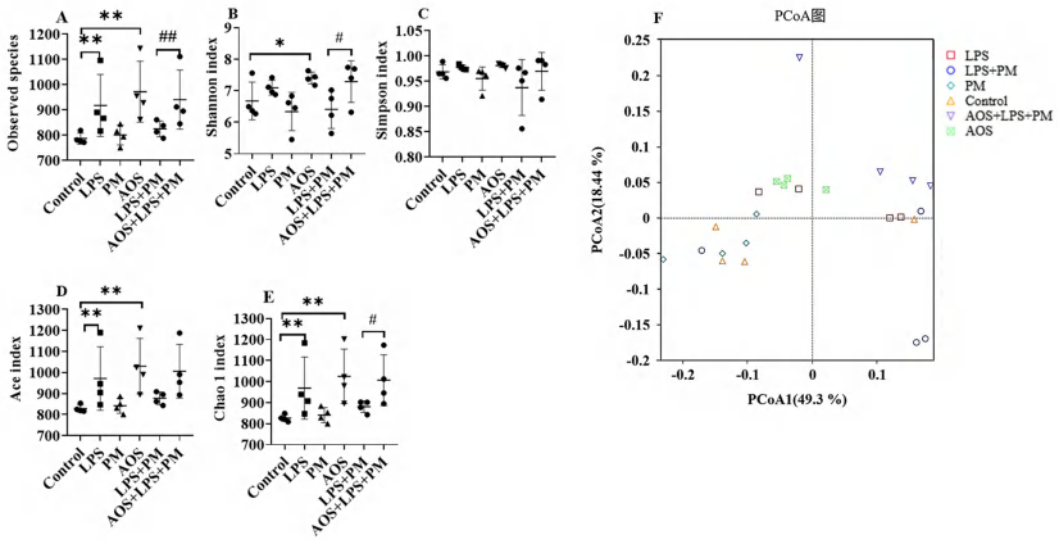


图 1　大鼠肠道菌群多样性分析

Fig 1　Diversity of gut microbiota in rats

注：与 Control 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 LPS ＋ PM 比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；

Note：*vs* the Control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the LPS ＋ PM group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

高；与 LPS ＋ PM 组相比，AOS ＋ LPS ＋ PM 组大鼠瘤胃球菌科（Ruminococcaceae）丰度显著提高，而肠球菌科丰度显著降低。

在属水平上（见图 2C ～ F），与 Control 组相比，LPS 组大鼠 *Escherichia-Shigella* 丰度显著提高，PM 组大鼠 *Lachnospiraceae*_NK4A136_group 丰度显著降低（$P < 0.05$）；AOS 可显著提高阿克曼菌（*Akkermansia*）和肠球菌丰度；与 LPS 组相比，LPS＋PM 组大鼠肠球菌丰度显著升高（$P < 0.05$）；与 LPS ＋ PM 组相比，AOS ＋ LPS ＋ PM 组大鼠瘤胃球菌科丰度显著提高，而肠球菌丰度显著降低（$P < 0.05$）。

3.3　肝脏代谢组学变化

所有 ^{1}H-NMR 谱均经傅里叶变换、相位和基线调整，使用 MestReNova 核磁图谱处理软件依据 TSP 信号（δ_{H} 0.00）对谱图进行化学位移校正，通过化学位移、耦合常数、二维谱等核磁数据分析，结合 HMDB 数据库以及参考文献，共指认 18 种内源性代谢物，见图 3 及表 1。对总峰面积的数据进行归一化，将数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 软件，进行 PCA 和 OPLS-DA。通过 PCA，可以看出各组有分离的趋势。利用 OPLS-DA 中 S-plot 图考察对分组的贡献大的成分，基于该模型，筛选出 VIP ＞ 1 同时 $P < 0.05$ 的变量作为差异代谢物。LPS ＋ PM 组与 Control 组相比，3- 羟基丁酸、谷氨酸、谷氨酰胺、谷胱甘肽、二甲基甘氨酸、胆碱、邻磷酸胆碱以及甘氨酸水平显著下降（$P < 0.05$），AOS ＋ LPS ＋ PM 组与 LPS ＋ PM 组相比，甘氨酸、3- 羟基丁酸、赖氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、谷胱甘肽、二甲基甘氨酸、酪氨酸水平显著升高（$P < 0.05$）。

另外，采用 UHPLC/Q-Orbitrap MS 在正、负离子两种模式下对大鼠肝组织进行代谢组学分析。采用无监督的 PCA 对大鼠肝脏样本的代谢轮廓进行分析，得到各组正负离子模式下的代谢轮廓图，见图 4A，结果显示，各组大鼠肝脏代谢物能够明显分离，与核磁代谢组结果类似，AOS、LPS 和 PM 均引起大鼠体内代谢物的变化。表 2 结果显示，LPS ＋ PM 组与 Control 组相比，黄嘌呤、芥酸酰胺、*L*- 异亮氨酸、4- 氧代脯氨酸、*D*- 焦谷氨酸、4- 十二烷基苯磺酸、胆碱、*N*- 棕榈酰基 -*D*- 赤藓氨醇、*D*- 甘露糖、普瑞巴林、DABCO、纳多洛尔、甜菜碱、*D*- 谷氨酰胺、硬脂酸、二十二酰胺、苯并噻唑、*L*- 组氨酸及 *D*-（＋）- 脯氨酸水平显著变化（$P < 0.05$）。图 4D 结果显示，AOS ＋ LPS ＋ PM 组与 LPS ＋ PM 组相比，己二酸、N_1- 甲基 -2- 吡啶酮 -5- 甲酰胺、二氢胸腺嘧啶、肌酸酐、纳多洛尔、*L*- 异亮氨酸、二十二酰胺水平显著变化（$P < 0.05$）。

4　通路富集分析

将基于 ^{1}H-NMR 与 UHPLC-MS 法分析 AOS ＋ LPS ＋ PM 组与 LPS ＋ PM 组的差异代谢物（$P < 0.05$，VIP ＞ 1）在 MetaboAnalyst 5.0（https://www.metaboanalyst.ca）网站进行代谢通路富集分析，结果见图 5，横坐标为 VIP 值，纵坐标为 *P* 值水平。共筛选出 22 条代谢通路，包括 *D*- 谷氨酰胺

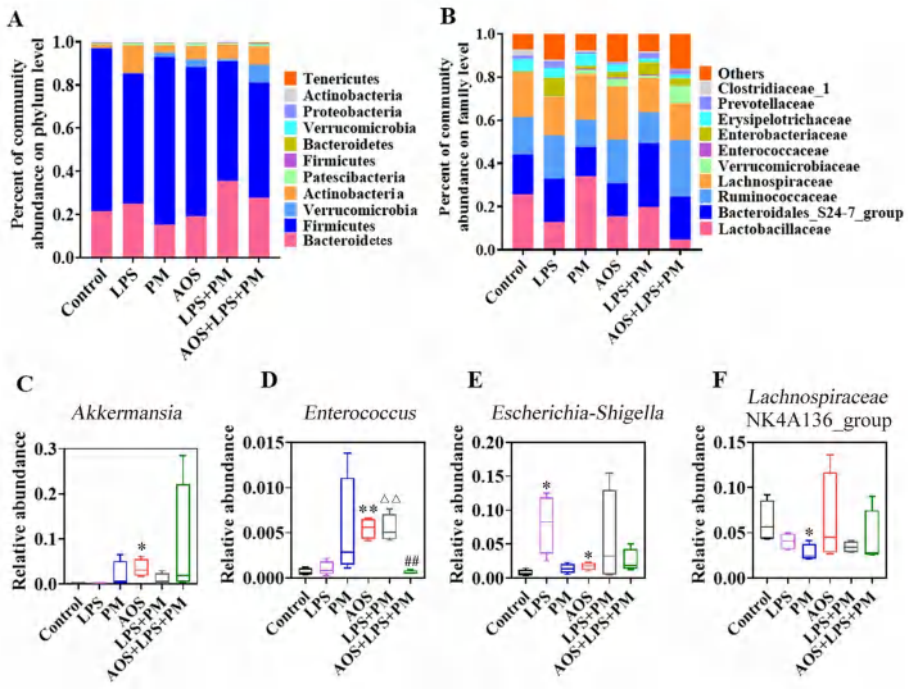


图 2 肠道菌群组成变化分析

Fig 2 Changes in the composition of gut microbiota

A. 门水平丰度柱状图（percent of community abundance on phylum level）；B. 菌群水平丰度柱状图（percent of community abundance on genus level）；C. *Akkermansia* 相对丰度（relative abundance of *Akkermansia*）；D. *Enterococcus* 相对丰度（relative abundance of *Enterococcus*）；E. *Escherichia-Shigella* 相对丰度（relative abundance of *Escherichia-Shigella*）；F. *Lachnospiraceae*_NK4A136_group 相对丰度（relative abundance of *Lachnospiraceae*_NK4A136_group）

注：与 Control 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 LPS 组比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$；与 LPS ＋ PM 组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* the Control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the LPS group，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$；*vs* the LPS ＋ PM group，$^{\#\#}P < 0.01$.

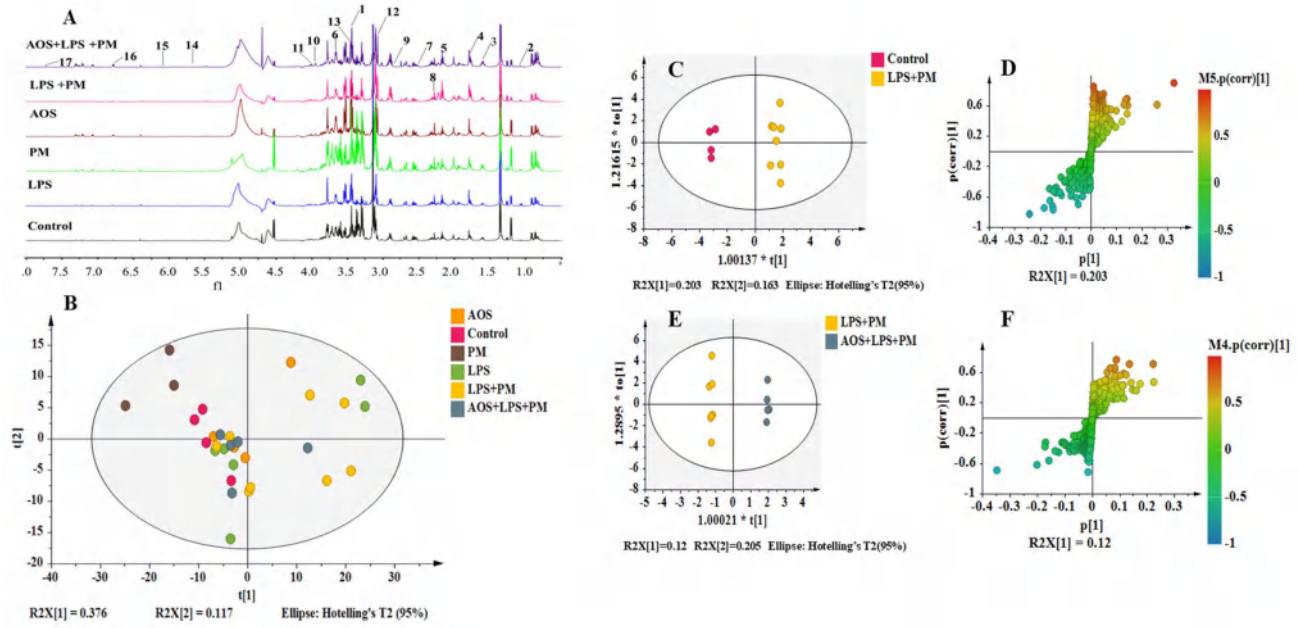


图 3 ^{1}H-NMR 及 SIMCA 分析图

Fig 3 ^{1}H-NMR and SIMCA

A. 大鼠肝脏代谢 ^{1}H-NMR 图谱（^{1}H-NMR of liver metabolism）；B. PCA 得分图（PCA score）；C. Control 组和 LPS ＋ PM 组 OPLS-DA 得分图（OPLS-DA score plots of the control group and the LPS ＋ PM group）；D. Control 组和 LPS ＋ PM 组 S-plot 图（S-plots of control group and the LPS ＋ PM group）；E. LPS ＋ PM 组和 AOS ＋ LPS ＋ PM 组 OPLS-DA 得分图（OPLS-DA score plots of the LPS ＋ PM group and the AOS ＋ LPS ＋ PM group）；F. LPS ＋ PM 组和 AOS ＋ LPS ＋ PM 组 S-plot 图（S-plot of the LPS ＋ PM group and the AOS ＋ LPS ＋ PM group）

表 1　大鼠肝脏 ^{1}H-NMR 图谱中指认代谢物峰归属

Tab 1　Metabolite peaks identified by ^{1}H-NMR spectra of the rat liver

序号	代谢物	化学位移	差异代谢物相对含量	
			LPS ＋ PM 组与 Control 组相比	AOS ＋ LPS ＋ PM 组与 LPS ＋ PM 相比
1	甘氨酸	3.56（s）	—	↑
2	3- 羟基丁酸	1.20（d），3.33（d）	↓	↑
3	赖氨酸	1.74（m），1.88（m）	—	↑
4	乙酸	1.91（s）	—	—
5	谷氨酸	2.02（m），2.17（m），2.32（m）	↓	↑
6	谷氨酰胺	2.16（m），2.42（m），3.78（t）	↓	↑
7	谷胱甘肽	2.17（m），2.54（m）	↓	↑
8	琥珀酸	2.39（s）	—	—
9	二甲基甘氨酸	2.91（s），3.71（s）	↓	↑
10	肌酸	3.02（s），3.95（s）	—	—
11	胆碱	3.20（s），4.05（m）	↓	—
12	邻磷酸胆碱	3.21（s），3.58（s）	↓	—
13	甘氨酸	3.58（s）	↓	—
14	尿嘧啶	5.81（d），7.55（d）	—	—
15	胞苷	6.07（d），7.84（d）	—	—
16	酪氨酸	6.90（d），7.19（d）	—	↑
17	黄嘌呤	7.89（s）	—	—
18	二磷酸腺苷	8.46（s）	—	—

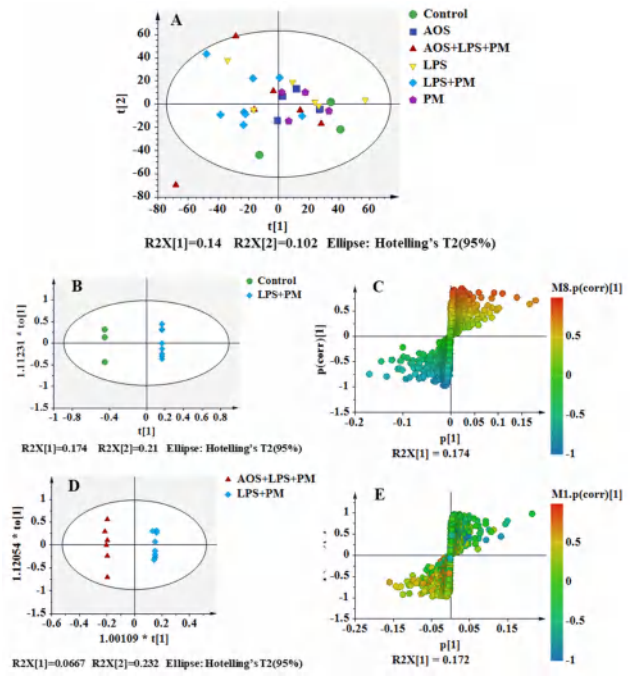


图 4　UHPLC-MS 肝脏代谢组学的 SIMCA 分析图

Fig 4　SIMCA analysis of UHPLC-MS liver metabolomics

A. PCA 得分图（PCA score map）；B. Control 组和 LPS ＋ PM 组 OPLS-DA 得分图（OPLS-DA score plots between Control group and LPS ＋ PM group）；C. Control 组和 LPS ＋ PM 组 S-plot 图（S-plot between Control group and LPS ＋ PM group）；D. LPS ＋ PM 组和 AOS ＋ LPS ＋ PM 组 OPLS-DA 得分图（OPLS-DA scores plots between LPS group ＋ PM and AOS ＋ LPS ＋ PM group）；E. LPS ＋ PM 组和 AOS ＋ LPS ＋ PM 组 S-plot 图（S-plot between LPS group ＋ PM and AOS ＋ LPS ＋ PM group）

表 2　基于 LC-MS 法鉴别大鼠肝脏差异代谢物

Tab 2　Differential metabolites of the rat liver identified by LC-MS

名称	分子式	保留时间 /min	LPS ＋ PM 组与 Control 组相比	AOS ＋ LPS ＋ PM 组与 LPS ＋ PM 组相比
黄嘌呤	$C_5H_4N_4O_2$	1.381	↓	—
芥酸酰胺	$C_{22}H_{43}NO$	9.960	↑	—
L- 异亮氨酸	C_3HNO_3S	1.779	↓	↓
4- 氧代脯氨酸	$C_5H_7NO_3$	1.232	↑	—
D- 焦谷氨酸	$C_5H_7NO_3$	1.231	↑	—
4- 十二烷基苯磺酸	$C_{17}H_{28}O_3S$	9.720	↓	—
胆碱	$C_{10}H_{22}N_2O_3$	0.699	↑	—
N- 棕榈酰基 -*D*- 赤藓氨醇	$C_{34}H_{67}NO_3$	9.906	↓	—
D- 甘露糖	$C_6H_{12}O_6$	0.723	↓	—
普瑞巴林	$C_8H_{17}NO_2$	1.048	↓	—
DABCO	$C_6H_{12}N_2$	10.074	↓	—
纳多洛尔	$C_{17}H_{27}NO_4$	4.631	↑	↑
甜菜碱	$C_5H_{11}NO_2$	9.405	↑	—
D-（－）谷氨酰胺	$C_5H_{10}N_2O_3$	0.658	↑	—
硬脂酸	$C_{18}H_{36}O_2$	8.815	↑	—
二十二酰胺	$C_{22}H_{45}NO$	9.981	↓	↑
苯并噻唑	C_7H_5NS	10.047	↓	—
L- 组氨酸	$C_6H_9N_3O_2$	0.794	↑	—
D-（＋）- 脯氨酸	$C_5H_9NO_2$	0.716	↑	—
己二酸	$C_6H_{10}O_4$	1.919	—	↓
N_1- 甲基 -2- 吡啶酮 -5- 甲酰胺	$C_7H_8N_2O_2$	1.815	—	↓
二氢胸腺嘧啶	$C_5H_8N_2O_2$	0.704	—	↓
肌酸酐	$C_4H_7N_3O$	0.718	—	↓

和 *D*- 谷氨酸代谢，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成，谷胱甘肽代谢，丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，氨酰基 -tRNA 生物合成等代谢通路。

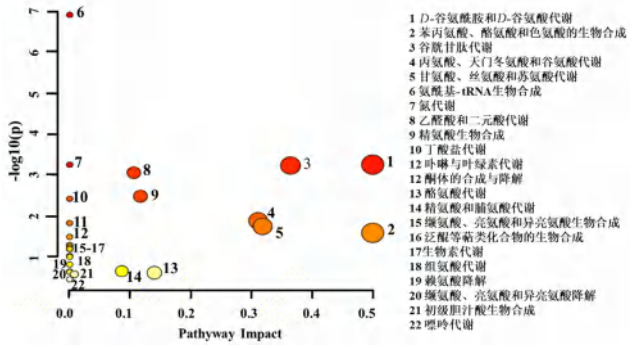


图 5 肝脏代谢通路的 MetPA 分析

Fig 5 MetPA analysis of the liver metabolic pathways

5 讨论与小结

本研究基于 LPS 特异质肝损伤模型，发现何首乌可诱导大鼠肝损伤，而 AOS 具有保肝作用 [10]，但是未见其对肠道菌群和代谢组学的相关研究报道。因此，本研究采用 LPS 诱导的特异质肝损伤模型，探讨 AOS 对何首乌致大鼠特异质肝损伤的保护作用。多糖是生物大分子，在肠道内可在肠道菌群水解酶、多糖裂合酶的作用下发生降解，因此本研究首先考察了其对肠道菌群的影响。AOS 能提高正常大鼠肠道菌群的多样性，虽然 LPS ＋ PM 对肠道菌群的多样性影响不大，但预先基于 AOS 能显著升高 Observed species 指数、Shannon 指数和 Chao 1 指数。在肠道菌群组成变化分析中发现，AOS 能提高疣微菌门、疣微菌科以及阿克曼菌丰度，据报道阿克曼菌有肝保护的作用 [11]，AOS 能降低肠球菌丰度，而肠球菌是一种有害菌 [12]。在 LPS 诱导的何首乌致肝损伤模型中，预先给予 AOS，发现疣微菌门、瘤胃球菌科丰度显著提高，推测 AOS 可能对于肝损伤的治疗具有积极的意义。多糖无紫外吸收，体内代谢追踪困难，因此本研究采用代谢组学的方法研究多糖对生命活动的干预。本文基于 ^{1}H-NMR 技术和 UHPLC-MS 技术发现，AOS 能显著改变 SD 大鼠肝脏内源性代谢物的变化。在何首乌诱导的特异质肝损伤模型中，预先给予 AOS 可逆转肝损伤大鼠肝脏中谷胱甘肽、谷氨酸和谷氨酰胺含量的降低，主要引起 *D*- 谷氨酰胺和 *D*- 谷氨酸代谢通路的变化。谷胱甘肽广泛应用于临床上治疗各种肝病，谷氨酸与谷氨酰胺则是参与合成谷胱甘肽的物质 [13]。由此推测，在何首乌引起的特异质肝损伤模型中，AOS 可能通过提高某些肠道菌如疣微菌门、瘤胃球菌科丰度以及 *D*- 谷氨酰胺和 *D*- 谷氨酸代谢通路发挥保护作用。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：183-184.

[2] 柏兆方，高源，王伽伯，等 . 中药特异质肝损伤评价及风险防控对策研究 [J]. 药学进展，2020，44（10）：7324-729.

[3] Falkeborg M，Cheong LZ，Gianfico C，et al. Alginate oligosaccharides：enzymatic preparation and antioxidant property evaluation [J]. Food Chem，2014，164：185-194.

[4] Lu S，Na K，Wei JN，et al. Alginate oligosaccharides：the structure-function relationships and the directional preparation for application [J]. Carbohydr Polym，2022，284：119225.

[5] Wang MP，Chen L，Zhang ZJ. Potential applications of alginate oligosaccharides for biomedicine-a mini review [J]. Carbohydr Polym，2021，271：118408.

[6] Zhang Y，Guo CC，Li YR，et al. Alginate oligosaccharides ameliorate DSS-induced colitis through modulation of AMPK/NF-κB pathway and intestinal microbiota [J]. Nutrients，2022，14：2864.

[7] Li TT，Huang SM，Wang J，et al. Alginate oligosaccharides protect against fumonisin B1-induced intestinal damage via promoting gut microbiota homeostasis [J]. Food Res Int，2022，152：110927.

[8] 周秋香，余晓斌，涂国全，等 . 代谢组学研究进展及其应用 [J]. 生物技术通报，2013（1）：49-55.

[9] 任红微，蒲位凌，魏静，等 . 制何首乌肝损伤的化学物质及中药多糖或寡糖配伍干预研究 [J]. 生物医学转化，2021，2（3）：62-82.

[10] Li SY，He NG，Wang LN. Efficiently Anti-obesity effects of unsaturated alginate oligosaccharides（UAOS）in high-fat diet（HFD）-fed mice [J]. Mar Drugs，2019，17（9）：540.

[11] 王廷玮 . 高脂膳食模式下真菌毒素 AFB1 及 ZEN 长期暴露致小鼠“肠 - 肝轴”损伤机制及干预研究 [D]. 无锡：江南大学，2022.

[12] 南海峰 . 益生菌治疗对慢性乙型肝炎肝硬化亚临床肝性脑病患者临床疗效及对血氨和肠道菌群的影响 [J]. 保健医学研究与实践，2021，18（S1）：94-96.

[13] 卢佃华 . 谷胱甘肽的药理作用及研究新进展 [J]. 中国医药指南，2013，11（29）：40-41.

（收稿日期：2023-03-01；修回日期：2023-03-05）

大血藤质子核磁共振指纹图谱研究

裴洁荣[1]，金如意[1]，苏梅[1]，朱健[1]，黄盛洁[1]，张鹏[1, 2]，姜苗苗[1, 2*]（1. 天津中医药大学，组分中药国家重点实验室，天津　301617；2. 现代中医药海河实验室，天津　301617）

摘要：目的　建立不同产地大血藤 ^{1}H-NMR 指纹图谱，并进行差异性分析。**方法**　采用 CPMG 脉冲序列采集样品 ^{1}H-NMR 信号，测定温度 298 K，观测频率 600 MHz，数据经分段积分，归一化处理后导入 MetaboAnalyst 5.0 软件进行统计分析。**结果**　建立了大血藤 ^{1}H-NMR 指纹图谱，并鉴定了 13 种化学成分，主成分分析、聚类分析结果表明 13 批大血藤药材有显著差异，方差分析结果筛选出绿原酸乙酯、正十六烷酸、红景天苷、葡萄糖、3，5-*O*- 二甲基没食子酸、丁香醛、蔗糖、表儿茶素、绿原酸为影响大血藤质量的主要差异性成分。**结论**　建立了大血藤 ^{1}H-NMR 指纹图谱并筛选出差异性成分，为评价不同来源大血藤药材的质量提供了参考。

关键词：大血藤；指纹图谱；主成分分析

中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1707-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.003

^{1}H-NMR fingerprint of Sargentodoxae Caulis

PEI Jie-rong[1], JIN Ru-yi[1], SU Mei[1], ZHU Jian[1], HUANG Sheng-jie[1], ZHANG Peng[1, 2], JIANG Miao-miao[1, 2*] (1. *State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin*　301617; 2. *Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin*　301617)

Abstract: Objective　To establish ^{1}H-NMR fingerprint of Sargentodoxae Caulis from different habitats, and analyze the differences. **Methods**　The ^{1}H-NMR spectrum of the sample was collected by CPMG pulse sequence. The measurement temperature was 298 K and the observation frequency was 600 MHz. The data were segmented and normalized, and then imported into MetaboAnalyst 5.0 software for statistical analysis. **Results**　^{1}H-NMR fingerprint of Sargentodoxae Caulis was established and 13 compounds were calibrated. Principal components analysis and cluster analysis showed significant differences among the 13 sample batches of Sargentodoxae Caulis. ANOVA showed that ethyl chlorogenate, octadecanoic acid, salidroside, glucose, 3, 5-*O*-dimethyl gallic acid, syringaldehyde, sucrose, epicatechin and chlorogenic acid were the main differential ingredients. **Conclusion**　The ^{1}H-NMR fingerprint of Sargentodoxae Caulis is established, and the differential ingredients are screened, which provide a reference to evaluate the quality of Sargentodoxae Caulis of different sources.

Key words: Sargentodoxae Caulis; fingerprint; principal component analysis

大血藤，习称红藤，又名血藤、红皮藤等，为木通科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata*（Oliw.）Rehd. et Wils. 的干燥藤茎，具有清热解毒、活血、祛风止痛等功效[1]。现代药理研究表明，大血藤可用于治疗肠痈腹痛、热毒疮疡、经闭、痛经、跌扑肿痛、风湿痹痛。作为治疗子宫内膜异位症的有效药对及药物组合药味之一，大血藤备受关注，戴德英教授[2]独创红藤方用于子宫内膜异位症治疗，后人研究其机制，发现与激素类药物不同，红藤方具有综合抗炎作用，治疗效果更可靠[3]。有研究报道大血藤中绿原酸、原儿茶酸、3，4- 二羟基苯乙醇等苯丙素类和酚酸

基金项目：现代中医药海河实验室科技项目（No.22HHZYJC00003）。

作者简介：裴洁荣，女，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究，email：jierong7018@163.com　*通信作者：姜苗苗，女，研究员，主要从事中药药效物质基础及质量控制研究，email：miaomiaojiang@126.com

类成分为其药效成分。

目前研究人员在大血藤含量测定相关研究方面大多采用苯丙素类成分和酚酸类成分为指标性成分，如绿原酸、红景天苷[4]、咖啡酸、香草酸[5]、原花青素 B_2 和表儿茶素[6]等。但大血藤药材本身因素也会影响其指标成分的含量，从而影响质量评价的结果。不同生长年限的大血藤药材含量差异明显，4 ～ 5 年生的大血藤含量最为稳定[7]；不同产地、批次的大血藤含量也会有所影响。已有研究人员采用高效液相色谱法得出产地不同的大血藤各成分含量差异很大[4]，批次不同药材中也会出现几种指标成分未检出的现象[8]。

核磁共振指纹图谱（NMR）是研究处于强磁场中的原子核对射频辐射的吸收，从而获得有关化合物分子结构信息的分析方法。所得到核磁共振图谱是独有的，因其具有高度的重现性和特征性的优点，可评价药材和中成药质量的均一性和稳定性[9]。质子核磁共振指纹图谱（^{1}H-NMR）作为 NMR 主要研究内容，所需样品少，扫描时间短，容易获得[10]，能全面地检测药材整体化学成分，检测出多种类型成分，且与 HPLC 指纹图谱相比，样品前处理简单，定量分析无需对照品，与 HPLC-UV 相比，可在不进行衍生化或分离下测定初级代谢产物[11]，弥补传统方法的不足。

因此，本试验测定湖北、江西、河南等地、不同批次大血藤的 ^{1}H-NMR，进行差异性分析，以进一步明确大血藤药效物质基础，为其鉴定、质量控制与评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高速万能粉碎机（北京市永光明医疗仪器有限公司，型号 FW-80）；万分之一天平（德国 Sartorius 公司）；涡旋振荡器（Labnet International 公司）；超声波多频清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司，型号 SB-5200DTS）；常温离心机（德国 Eppendorf 股份公司）；5 mm 标准核磁管（美国 Norell 公司）；超导核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司，Bruker 600 MHz）。

1.2 试药

收集安徽、广西、湖北、河南、江苏、江西、陕西、浙江 8 个产地的大血藤药材，共 13 个批次（见表 1），经天津中医药大学中医药研究院吴红华副研究员鉴定为木通科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata*（Oliw.）Rehd. et Wils. 的干燥藤茎。氘代甲醇（CD_3OD，含量：99.8%，青岛腾龙微波科技有限公司）；3-（三甲基甲硅烷）丙酸 -d_4 钠盐（TSP-d_4，含量：98%，美国 Sigma-Aldrich 公司）。

表 1 大血藤样品来源

Tab 1 Source of Sargentodoxae Caulis samples

No.	产地	批号	No.	产地	批号
AHA	安徽	2006001	JX	江西	150401
AHB	安徽	150401CP0023	SXA	陕西	C20080209
AHC	安徽	1710001	SXB	陕西	20180219
GX	广西	20191201	ZJA	浙江	8013405
HB	湖北	200401	ZJB	浙江	12201109
HN	河南	190401CP0023	ZJC	浙江	181101
JS	江苏	20200726			

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取大血藤药材样品，粉粹后过 80 目筛，精密称取药材细粉 50 mg 置离心管中，加入 1.0 mL 氘代甲醇（含内标 0.01% TSP-d_4），冷浸 30 min，超声 30 min，以 14 000 r • min^{-1} 离心 10 min，精密吸取 0.55 mL 上清液至 5 mm 核磁管中，加封，直接用于 ^{1}H-NMR 测试。

2.2 ^{1}H-NMR 测定条件

采用 cpmgpr1d 脉冲序列，测定温度 298 K，观测频率 600 MHz，扫描次数为 32 次，接受增益为 188.5，弛豫时间为 5 s，信号采集时间为 2.7263 s，谱宽 12 019.2 Hz，以 TSP 信号的化学位移值定标。

2.3 ^{1}H-NMR 指纹图谱测定与数据处理

将供试品溶液按照“2.2”项下测试条件分别进行 ^{1}H-NMR 测定，得到的 ^{1}H-NMR 信号导入 MestReNova 软件进行傅里叶转换，调整相位，校正基线，以内标 TSP-d_4 峰为基准校正化学位移，即可获得各样品的 ^{1}H-NMR 图谱。

2.3.1 分段积分 选择 δ 0.001 作为化学位移值单位对 δ － 0.15 ～ 10.0 内的图谱进行分段积分，并对总峰面积进行归一化处理，输出数据即可得到各化学位移值段与相对应的信号峰面积积分值（扣除甲醇峰信号 δ 3.27 ～ 3.35 和水峰信号 δ 4.80 ～ 4.90）。根据相似度计算原理（皮尔森相关系数法），按下列公式利用 Excel 2016 软件进行相似度分析，同时将得到的数据导入 MetaboAnalyst 5.0 软件进行统计分析。

$$r=\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{x})^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(y_i-\bar{y})^2}}$$

2.3.2 共有峰积分 选取图 1 中 1、2、3、4、6、7、8、9、12 号化学成分中不重叠的质子信号峰作为共有峰，计算积分面积。积分区间分别为 δ 1.21 ～ 1.24、δ 1.26 ～ 1.29、δ 2.80 ～ 2.83、δ 3.23 ～ 3.26、δ 3.88 ～ 3.89、δ 3.92 ～ 3.94、δ 5.36 ～ 5.38、δ 5.91 ～ 5.93、δ 6.81 ～ 6.83。

2.4 方法学考察

2.4.1　精密度　取同一份大血藤供试品溶液按照“2.2”项下条件连续测定 6 次，采用“2.3”项下数据处理方法，分段积分计算相似度，共有峰积分面积计算 *RSD* 值。

2.4.2　重复性　取同一批次大血藤样品按照“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样测定，采用“2.3”项下数据处理方法，分段积分计算相似度，共有峰积分面积计算 *RSD* 值。

2.4.3　稳定性　取同一份大血藤供试品溶液分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 按照“2.2”项下条件测定，采用“2.3”项下数据处理方法，分段积分计算相似度，共有峰积分面积计算 *RSD* 值。

3　结果与分析

3.1　大血藤提取物的 ^{1}H-NMR 指纹图谱

大血藤提取物的 ^{1}H-NMR 指纹图谱见图 1，质子信号峰分布在 δ 0 ～ 10，根据图谱信号峰的化学位移值与偶合裂分情况，通过与参考文献 [12-19] 数据比对的方法对大血藤提取的 ^{1}H-NMR 指纹图谱信号进行归属，鉴定了 13 个成分，主要为酚酸类化合物（红景天苷、原儿茶酸、没食子酸、3，5-*O*-二甲基没食子酸、3，4-二羟基苯乙醇、3，4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷、绿原酸、绿原酸乙酯、表儿茶素、丁香醛）和其他类化合物（葡萄糖、蔗糖、正十六烷酸），质子信号详细归属见表 2。

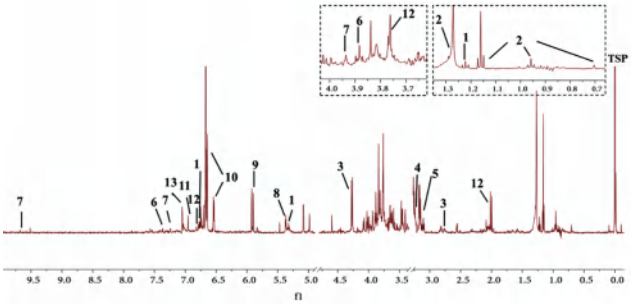


图 1　大血藤提取物的 ^{1}H-NMR 指纹图谱

Fig 1　^{1}H-NMR fingerprint of extracts from Sargentodoxae Caulis

表 2　大血藤提取物中 13 种化学成分 ^{1}H-NMR 信号归属

Tab 2　^{1}H-NMR signal attribution of 13 chemical components in the extract of Sargentodoxae Caulis

峰号	化学成分	δ ^{1}H
1	绿原酸乙酯 [12]	1.22（t），3.76（m），4.08（m），5.33（d），6.77（d），6.96（d），7.03（s），7.57（s）
2	正十六烷酸 [13]	0.7（s），0.85（s），0.96（s），1.01（s），1.15（m），1.27（s）
3	红景天苷 [14]	2.76（s），2.82（d），3.76（m），4.28（d），5.09（d），6.74（d），7.05（d）
4	葡萄糖 [14]	3.25（dd），3.41（m），3.46（m），3.64（m），3.76（m），3.80（m），5.09（d）
5	3，4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷 [12]	2.56（m），3.17（m），3.33（s），3.46（m），3.78（m），4.01（m），4.27（dd），6.54（dd），6.65（d），6.67（d）
6	3，5-*O*-二甲基没食子酸 [15]	3.88（s），7.37（s）
7	丁香醛 [16]	3.94（s），7.24（d），9.67（s）
8	蔗糖 [17]	3.54（m），3.82（m），5.37（d）
9	表儿茶素 [15]	2.80（m），4.18（s），5.90（d），5.92（d），6.74（d），6.78（m），6.96（d）
10	3，4-二羟基苯乙醇 [12]	2.56（m），3.46（m），6.54（dd），6.65（d），6.67（d）
11	原儿茶酸 [12]	6.74（d），6.96（d），7.05（d）
12	绿原酸 [18]	2.01（m），2.07（m），3.77（d），4.27（d），5.35（m），6.82（d），7.03（d），7.55（d）
13	没食子酸 [19]	7.05（d）

由图 2 可知，不同产地大血藤 ^{1}H-NMR 图谱之间具有差异性，与解析的大血藤中化学成分的信号峰比对，正十六烷酸、红景天苷、蔗糖、表儿茶素含量差异较大，正十六烷酸在 SXA、HN、JX 等批中含量较高，表儿茶素在 AHA、HN、HB 等批中含量较高，红景天苷在 JS、ZJB、ZJC 等批中含量较高，蔗糖则在 HN、AHA 批中含量高，在 JS、ZJA、ZJC 中含量很低。

3.2　方法学考察结果

精密度、重复性、稳定性试验中相似度结果均在 0.99 以上，共有峰积分面积 *RSD* 分别在 0.55% ～ 2.4%、0.62% ～ 2.1%、0.62% ～ 4.0%，表明方法精密度、重复性良好，供试品溶液在 12 h 内稳定。

3.3　统计分析

3.3.1　主成分分析（PCA）　本试验共有 8 个产地 13 批大血藤样品（n = 3），将 NMR 数据导

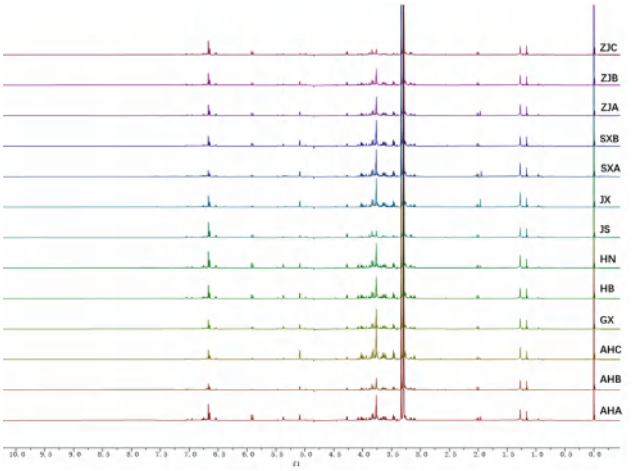


图 2　不同产地大血藤样品的 ^{1}H-NMR 指纹图谱

Fig 2　^{1}H-NMR fingerprint of Sargentodoxae Caulis samples from different habitats

入 MetaboAnalyst 5.0 软件对其进行 PCA，结果 13 批次大血藤样品之间存在相似性与差异性，具有较好的区分度，AHC、JX、AHB、JS、ZJC、SXA 批次样品间有明显的差异，而 HB、AHA、SXB 等批次较为接近（见图 3）。

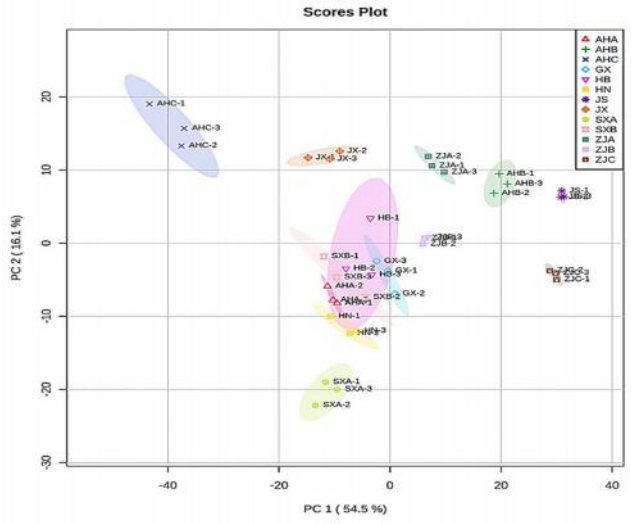


图 3 13 批不同产地来源的大血藤样品主成分分析得分图（椭圆内置信区间为 0.95）

Fig 3 Scores of principal component analysis for 13 batches of Sargentodoxae Caulis samples from different habitats（confidence interval within ellipse 0.95）

3.3.2 聚类分析（CA） 应用 MetaboAnalyst 5.0 软件对大血藤样品进行 CA，结果见图 4。13 批大血藤样品具有差异，大致可分为 4 组，组间差异较大，组内较为相似，其中 ZJB、ZJA、ZJC、JS、AHB 批为一组，HB、GX、SXB、AHA、HN、JX 批为一组，SXA、AHC 批则各为一组。

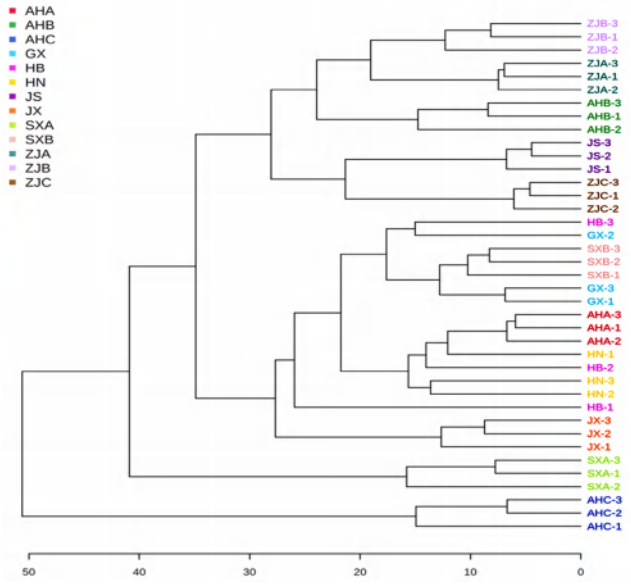


图 4 13 批不同产地来源大血藤样品聚类分析树状图

Fig 4 Cluster analysis tree for 13 batches of Sargentodoxae Caulis samples from different habitats

3.3.3 方差分析 为了进一步查明引起不同来源的大血藤样品之间差异性的化学成分，采用 MetaboAnalyst 5.0 软件进行单因素方差分析（ANOVA），筛选 13 批样品中的差异性成分，图 5 中显示了大血藤 ^{1}H-NMR 指纹图谱数据单因素方差分析情况，总共有 9973 个特征值，以 0.05 为分界值，有 3029 个特征值被认为 $P < 0.05$，为具有意义的特征值，即表示为差异性成分，共有 6944 个特征值不表示差异性。

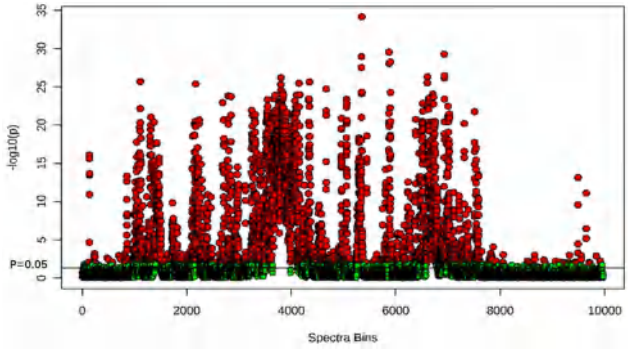


图 5 大血藤样品的单因素方差分析

Fig 5 One-way ANOVA for Sargentodoxae Caulis

应用单因素方差分析结果结合大血藤 ^{1}H-NMR 指纹图谱信号归属解析的化学成分，筛选 13 批大血藤样品中影响质量的差异性成分（$P < 0.05$）为：绿原酸乙酯、正十六烷酸、红景天苷、葡萄糖、3，5-*O*- 二甲基没食子酸、丁香醛、蔗糖、表儿茶素、绿原酸。

4 讨论

4.1 指纹图谱提取溶剂、内标物的选择

本试验指纹图谱的建立中提取溶剂采用氘代甲醇，前期采用氘代丙酮、氘代甲醇与重水混合两种溶剂进行提取，但氘代丙酮提取过程中存在对大血藤粉末溶解度低的情况，氘代甲醇与重水混合则会导致成分溶出不完全，测定指纹图谱基线不平整的情况。氘代甲醇对大血藤粉末溶出完全，图谱利于分析，因此，本试验采用氘代甲醇进行溶解提取。对于内标物，应具备不与样品发生反应，化学位移值与样品范围接近，信号峰不与样品信号峰重合的条件。TSP-d_4 能溶于氘代甲醇，且信号峰化学位移在 δ 0 左右，不影响样品信号峰的归属。因此，本试验采用 TSP-d_4 作为内标物。

4.2 指纹图谱脉冲序列的选择

大血藤中化学成分复杂，主要为酚酸类等小分子化合物，为了使指纹图谱中小分子化合物信号峰更明显、简洁，本试验采用 CPMG 脉冲序列测定大血藤 ^{1}H-NMR 指纹图谱，通过该脉冲序列的应用，图谱中大分子信号被消除，而小分子信号增强，且水峰信号降低，更利于后续对不同产

地大血藤 ^{1}H-NMR 指纹图谱的整体直观分析。

4.3　PCA 与 CA

PCA 和 CA 都是常用的多元统计分析方法，在中药领域常被用于中药材种类的鉴定、真伪的鉴别、质量的优劣 [20-21]。本试验结果表示出不同批次大血藤药材间的差异。PCA 二维得分图中 AHC、JX、AHB、JS、ZJC、SXA 批次样品间有明显的差异，而 HB、AHA、SXB 等批次较为接近，CA 树状图中 ZJB、ZJA、ZJC、JS、AHB 批为一组，HB、GX、SXB、AHA、HN、JX 批为一组，SXA、AHC 批则各为一组。两者相比发现，对 13 个批次的差异性判断相同，ZJC、JS 批具有较高的相似性，GX、HB、HN 批表现出相似性，其余批次间差异性较大，可认为不同产地大血藤样品具有差异。

4.4　单因素方差分析筛选差异性成分

通过单因素方差分析最终判断出 9 个成分为差异性成分，需要注意的是，特征峰应当为某化学成分独有，不与其他成分交叉，才能确定为这一成分对差异性的影响。温时媛等 [17] 对不同产地红景天苷进行 PCA，发现质量较好的批次中红景天苷、酪醇含量较高，质量较差的批次中红景天苷含量低，初生代谢产物含量高。而初生代谢产物是次生代谢过程中的前体物质，例如红景天苷在植物中以酪醇和尿苷二磷酸葡萄糖为底物 [22]，在酶的催化下合成，酪醇则是通过莽草酸途径合成。合成途径能够反映次生代谢产物与初生代谢产物的关系，提示筛选出的差异性成分之间可能存在某种关联，这种含量变化正是引起药材之间质量差异的关键因素。为了进一步研究差异性成分间的相互作用，笔者对 5 种差异性成分进行了 KEGG 代谢通路分析（见图 6），其中灰色背景代表筛选出的差异性成分，实线箭头代表一步生成，虚线箭头代表多步生成，差异性成分间主要通过糖酵解、氨基酸代谢等过程影响莽草酸途径。

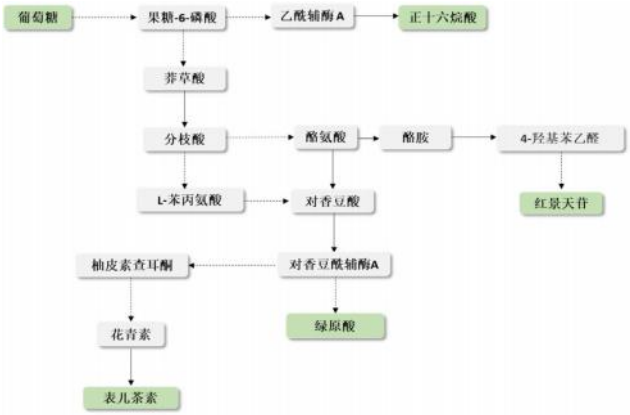


图 6　5 种差异性成分的 KEGG 代谢通路分析图

Fig 6　KEGG metabolic pathways for 5 different components

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：20-21.

[2] 束兰娣，宋知理，戴德英 . 红藤合剂治疗子宫内膜异位症 80 例疗效观察 [J]. 中医杂志，1999，40（9）：547-548.

[3] Zhuang MF，Cao Y，Shi Y，et al. Caulis Sargentodoxae prescription plays a therapeutic role with decreased inflammatory cytokines in peritoneal fluid in the rat endometriosis model [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020（9）:1-9.

[4] 李宛蓉，桂双英，王举涛，等 . 不同产地大血藤药材指纹图谱研究及红景天苷和绿原酸的含量测定 [J]. 安徽中医药大学学报，2014，33（6）：82-86.

[5] 荆彦民，马瑞丽 . HPLC 同时测定大血藤中绿原酸、咖啡酸和香草酸的含量 [J]. 中国现代应用药学，2016，33（5）：592-595.

[6] 陈兆榕，叶丽宏，华怡静，等 . UPLC 同时测定大血藤中 6 种成分含量 [J]. 药学研究，2020，39（8）：443-448，453.

[7] 计楚君，郑群飞 . 不同生长年限大血藤药材中 7 种成分的含量比较 [J]. 华西药学杂志，2020，35（5）：561-566.

[8] 李浩，赵凤春，袁贤达，等 . 大血藤药材和饮片中酚类和皂苷类成分的含量 [J]. 中国中药杂志，2015，40（10）：1865-1871.

[9] 徐妍，杨华蕊，杨永寿，等 . 中药指纹图谱研究现状及展望 [J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18（76）：91-94.

[10] 姜阳明，邹云云，黄滔，等 . 杜仲的核磁共振指纹图谱研究 [J]. 波谱学杂志，2017，34（4）：453-464.

[11] Liang QQ，Wang QY，Wang YY，et al. Quantitative ^{1}H-NMR spectroscopy for profiling primary metabolites in mulberry leaves [J]. Molecules，2018，23（3）：554.

[12] 陈智仙，高文远，刘岱琳，等 . 大血藤的化学成分研究（Ⅱ）[J]. 中草药，2010，41（6）：867-870.

[13] 巩玉静，董彩霞，周洋，等 . 山木通的化学成分研究 [J]. 中国野生植物资源，2011，30（2）：39-41.

[14] 洪道鑫 . 藏药狭叶红景天资源及质量分析研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2018.

[15] 毛水春 . 中药大血藤 *Sargentodoxa cuneata* 抗癌活性成分的分离与鉴定 [D]. 青岛：中国海洋大学，2003.

[16] 张文，周爽，孙成鹏，等 . 大血藤化学成分研究 [J]. 上海中医药杂志，2020，54（11）：85-88.

[17] 温时媛，周江韬，陈燕燕，等 . 红景天药材的 ^{1}H-NMR 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（13）：2629-2633.

[18] 廖丽云 . 绿原酸及冻干制剂质量标准、稳定性的研究和绿原酸精制品结构确证 [D]. 成都：四川大学，2005.

[19] 肖明明，周志红，赵昕，等 . HSCCC 法结合制备型 HPLC 技术靶向制备分离与鉴定大血藤中的多酚类化合物 [J]. 中医药导报，2018，24（23）：52-56.

[20] 彭琴，邹福贤，许少华，等 . 基于化学计量学的指纹图谱法鉴别金线莲及其混伪品 [J]. 药学研究，2021，40（3）：149-159.

[21] 王丽 . 沙棘的氢核磁共振图谱——多元统计分析研究 [D]. 成都：四川大学，2007.

[22] 崔晋龙，付少彬，王梦亮 . 红景天苷生物、化学和生物催化合成的分子理论及应用 [J]. 天然产物研究与开发，2013，25（6）：840，851-855.

（收稿日期：2022-12-20；修回日期：2023-03-17）

代谢组学在中药作用机制研究中的应用

张雨馨[1]，陈碧莹[1]，王丽明[1, 2]，邢彦超[1]，付志飞[1, 2]，韩立峰[1, 2*]（1. 天津市中药化学与分析重点实验室，天津中医药大学，天津 301617；2. 组分中药国家重点实验室，天津中医药大学，天津 301617）

摘要：代谢组学是系统生物学的重要组成部分，具有整体性、动态性等特点，与中医药的“整体观”“辨证观”相契合，是中医药现代化研究的一种重要方法，为揭示中医药的科学内涵和推动中医药国际化作出了重大贡献。本文综述了近年来代谢组学在中药作用机制研究中的应用，以期为后续研究提供参考。

关键词：代谢组学；中药；作用机制

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1712-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.004

Role of metabonomics in the active mechanism of traditional Chinese medicine

ZHANG Yu-xin[1], CHEN Bi-ying[1], WANG Li-ming[1, 2], XING Yan-chao[1], FU Zhi-fei[1, 2], HAN Li-feng[1, 2*] (1. *Tianjin Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Chemistry and Analysis*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Metabonomics (or metabolomics) is an important part of systematical biology, with the characteristics of integrity and dynamics. It is in line with the holistic viewpoint and dialectical viewpoint of traditional Chinese medicine (TCM). It is an important method in modern TCM research, and greatly contribute to revealing the scientific connotation of TCM and promoting its internationalization. This paper reviewed the application of metabonomics in the study of the active mechanism of TCM in recent years, aiming to provide reference for the follow-up research.

Key words: metabonomics; traditional Chinese medicine; active mechanism

随着分析技术的快速发展，代谢组学目前已广泛应用于生命科学相关的多项领域。它是后基因组时代的新兴学科，与基因组学、转录组学和蛋白质组学共同构成了“系统生物学”，主要借助现代分析技术、高通量的检测方法以及化学计量学的理论与方法，研究生物体整体或组织、细胞的动态代谢变化规律，是中医药学、生物学、药理病理学、临床医学等多个领域的研究热点[1-2]。本文综述了近年来代谢组学在中药作用机制研究中的应用，以期为后续研究提供参考。

1 代谢组学概述

1.1 研究对象

代谢组学的主要研究对象是分子量小于 1000 Da 的小分子代谢物，主要包括糖、脂质、氨基酸、有机酸、类萜和固醇等化合物[3-4]。

1.2 研究的实验流程

代谢组学的实验流程主要包括样本采集及处理、获取数据、分析数据、研究代谢途径等[5-9]。

1.2.1 样本采集及处理 根据实验设计，收集充足的实验样品，如对照组、模型组、给药组的血浆或组织样品。为减轻基质效应，保证分析的准确性和灵敏度，同时最大程度提取样品中包含的代谢物信息，需要对样品进行除杂、浓缩、离心等预处理。通常采用的预处理方法有固相微萃取、液相微萃取、蛋白质沉淀、微波辅助萃取、超临界萃取、微透析以及分子印迹技术等[10-11]。

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.82274362）。

作者简介：张雨馨，女，硕士研究生，主要从事中药代谢组学相关研究，email：zhangyuxinlz@163.com *通信作者：韩立峰，男，高级实验师，主要从事中药物质基础研究，email：hanlifeng@tjutcm.edu.cn

1.2.2　数据采集　代谢组学中常用的数据采集手段有磁共振波谱（NMR）、气相色谱 - 质谱联用（GC-MS）以及液相色谱 - 质谱联用（LC-MS）技术等 [12-13]。

NMR 技术是代谢组学研究领域的重要手段，包括核磁共振氢谱（^{1}H-NMR）和磁共振碳谱（^{13}C-NMR）。其主要优势有：分析速度快、效率高、不破坏样品、样品预处理简单、定性定量同时进行、检测范围广等 [14]。

GC-MS 与 LC-MS 技术都是将色谱的快速分离能力与质谱对特征离子的精准定性、定量能力相结合，近年来广泛应用于代谢组学研究。两者均具有灵敏度高、专属性强、分析结果准确可靠等优点 [15-16]。GC-MS 技术对于分子量小、弱极性和挥发性物质具有很好的检测优势，且用于物质定性的 GC-MS 数据库比较健全，但往往需要对样品进行衍生化处理，样品前处理比较烦琐，检测通量相对较小。而 LC-MS 技术无需对样品进行衍生化处理，进一步简化了样品制备步骤，适用于分析沸点高、不易挥发、不易衍生以及分子量相对较大的代谢物，且能够鉴定和分析痕量化合物 [17]。

1.2.3　数据分析　分析采集到的数据需要先进行预处理，常用商业软件有 Amix（Bruker）、Progenesis QI（Waters）、Compound Discoverer（Thermo）、Mass Profiler Professional（Agilent）及免费的 XCMS（https：//xcmsonline.scripps.edu/）　等。这些软件主要是对得到的谱图进行基线过滤，去除基线漂移并降噪，随后进行峰识别、分段积分、峰对齐、峰匹配、重叠峰解析并校正保留时间，对峰面积进行归一化等处理 [18]。

预处理后的数据可采用主成分分析（PCA）、偏最小二乘判别分析（PLS-DA）以及正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）等方法进行分析处理，通常使用 SIMCA P 软件进行分析。之后通过 HMDB、MassBank、mzCloud 等数据库以及对照品比对的方式鉴定化合物。最后，计算 OPLS-DA 模型中的变量重要性投影（variable importance inprojection，VIP）值，VIP 值＞ 1 意味着该化学成分的贡献较大，可作为引起不同样品之间差异的化学成分；利用 t 检验法的 P 值进行进一步筛选，当 P 值＜ 0.05，则表示差异有统计学意义；也可利用错误发现率（false discovery rate，FDR）对 P 值进行多重假设检验校正，校正后的 P 值即为 q 值，q 值＜ 0.05 则表明差异有统计学意义 [19-20]。最终筛选出差异标志物，分析代谢途径并验证，完成整体水平的代谢组学研究。

2　代谢组学在中药作用机制研究中的应用

中药具有多成分、多靶点的作用特点，其调控机制是通过多系统、多层次、多途径的方式实现的，而代谢组学是通过研究小分子代谢物的动态变化以揭示生物体生理病理状态和变化机制，两者在整体性、动态性等方面极为契合 [21-22]。近年来，代谢组学技术在中医药研究领域得到广泛应用，在毒性预测、质量评价、机制探究等方面均展现出巨大潜力，极大地推动了中医药的现代化发展进程 [23-25]。

2.1　单味中药代谢组学研究

单味中药由于含有多种化学成分，常常表现出复杂的药理作用，相当于一个小复方，故揭示其作用机制仍然是一个难题。近年来，国内外专家运用代谢组学技术对单味中药的作用机制进行了深入探索，取得了一定的研究成果。

肺癌是世界上发病率最高的疾病之一 [26]。在中医药中，款冬花（*Aconitum kusnezoffii* Reichb.）常用于治疗咳嗽、支气管炎和哮喘等肺部疾病 [27]。Li 等 [28-29] 发现款冬花的石油醚提取物（PEFF）在卵白蛋白（ovalbumin，OVA）诱导的大鼠哮喘模型中显示出保护作用，采用基于 ^{1}H-NMR 的代谢组学在细胞提取物和相应培养基中鉴定出 15 种与 PEFF 抗增殖作用相关的差异代谢产物，可能与丙酮酸代谢以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢有关。

大黄是一种传统中药，在现代中医药学中，大黄常被用于治疗肾纤维化 [30]。Zhang 等 [31] 应用超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱仪，研究了大黄石油醚、乙酸乙酯和正丁醇提取物对腺嘌呤所致慢性肾病（CKD）大鼠尿液代谢产物的影响。鉴定了 CKD 大鼠尿中的一系列差异代谢物，发现氨基酸、嘌呤、牛磺酸和胆碱代谢途径存在代谢障碍，而大黄石油醚、乙酸乙酯和正丁醇提取物均可完全或部分逆转尿代谢物的异常，改善代谢紊乱。

其他代表性研究结果如表 1 所示 [32-39]。

2.2　中药复方代谢组学研究

中药复方由不同中药根据中医理论配伍而成，其所含化学成分相较于单味药更复杂，导致其药效物质及作用机制的研究较为困难。代谢组学技术可以通过研究内源性小分子代谢物在体内的降解和转化规律，将中药复方作为一个整体，揭示其对生物体的整体影响，阐明作用机制，同时也可以采用不同组别的成分 - 药效相关分析，快速发现药效物质。

新生化颗粒是一种中药颗粒剂，由当归、甘

表 1 代谢组学在单味中药作用机制研究中的应用

Tab 1 Application of metabonomics in the study of active mechanism of single traditional Chinese medicine

研究内容	分析样品	分析技术	生物标志物	作用机制	文献
生姜、干姜与炒姜治疗血瘀综合征作用机制	大鼠血清、尿液	GC-TOF-MS	甲酰乙内脲，*D*-果糖，*L*-谷氨酰胺，甘油磷酸，鸟氨酸等	调节脂质、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸、淀粉和蔗糖、氨基糖和核苷酸糖、半乳糖、精氨酸和脯氨酸代谢	[32]
艾片（左旋龙脑）抗脑缺血作用机制	大鼠血清、脑组织	HPLC-IT-TOF-MS	左旋肉碱，苯乙哌啶，缬氨酸，甲氨蝶呤等	调节能量代谢、产热和胆汁分泌	[33]
单独和联合使用甘遂与甘草治疗恶性胸腔积液作用机制	大鼠尿液	UPLC-Q-TOF-MS	烟酰胺，烟酸，4-羟基环磷酰胺，*L*-丙氨酸等	调节含硒氨基酸代谢以及烟酸和烟酰胺代谢	[34]
茯苓治疗慢性肾病作用机制	大鼠尿液	UPLC-Q-TOF-MS	腺嘌呤，左旋肉碱，蛋氨酸等	调节腺嘌呤代谢和氨基酸代谢	[35]
光果甘草抗鼻咽癌作用机制	人鼻咽癌细胞	GC-MS	腺苷，木糖醇，异柠檬酸，谷氨酰胺，乳酸等	调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，脂肪酸生物合成，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，半胱氨酸和蛋氨酸代谢	[36]
波棱瓜子治疗肝纤维化作用机制	大鼠血清、肝组织	^{1}H-NMR	谷胱甘肽，谷氨酰胺，乳酸，缬氨酸等	调节能量代谢、氨基酸和核酸代谢	[37]
水牛角解热机制	大鼠血浆	UPLC-Q-TOF-MS	焦谷氨酸，棕榈酸酯，白三烯 A4 等	调节花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢	[38]
黄芪治疗肾病综合征作用机制	大鼠血清、尿液、肾组织	UPLC-Q-Exactive-MS	鞘磷脂，甘油磷脂，胆固醇等	调节甘油磷脂、鞘磷脂和脂肪酸代谢	[39]

草、川芎、干姜、桃仁、益母草、红花等中药组成，在我国广泛应用于治疗产后贫血 [40]。Pang 等 [41] 采用 UPLC-QTOF-MS 和多变量数据方法分析血浆代谢谱，发现新生化颗粒可能通过促进辅酶 A 生物合成、改善能量代谢、调节半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及鞘磷脂信号通路等途径，发挥良好的治疗贫血的作用。

茵陈蒿汤是中医经典方剂，被广泛用于治疗湿热黄疸综合征（阳黄证，DHJS）和各种肝病 [42]。Sun 等 [43-44] 采用 UPLC-Q-TOF-G2Si-MS 技术结合多变量统计分析方法对血清样本进行分析，鉴定出甘油磷酸胆碱、左旋肉碱、前列腺素 E2、白三烯 A4 等 22 个生物标志物，同时发现 15 个与茵陈蒿汤治疗 DHJS 相关的代谢途径，其中戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化途径是与茵陈蒿汤发挥治疗作用最相关的代谢途径。

其他代表性研究结果如表 2 所示 [45-60]。

2.3 中药活性成分的代谢组学研究

中药活性成分即中药中具有生物活性，可以发挥药理作用的化学成分。对于中药活性成分作用机制的研究，有助于进一步探明中药药效发挥的机制 [61]。

近年来，高尿酸血症的发病率不断升高，该病可诱发多种并发症，如糖尿病和高血压，严重危害人类健康 [62-63]。研究表明，荷叶碱和薯蓣皂苷均能降低血液中的尿酸水平，显著缓解高尿酸血症 [64-65]。Wang 等 [66] 从大鼠血浆和尿液中鉴定出 25 种与高尿酸血症密切相关的代谢产物，主要涉及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，酮体的合成和降解，丁酸代谢，丙酮酸代谢，柠檬酸循环，糖酵解与糖异生，乙醛酸和二羧酸代谢以及甘油磷脂代谢。结果表明，荷叶碱可通过改善代谢紊乱来缓解高尿酸血症。Tan 等 [67] 通过代谢组学和脂质组学研究，共发现有 52 种代谢产物与薯蓣皂苷改善氧嗪酸钾（PO）诱导的高尿酸血症密切相关。这些代谢产物主要涉及精氨酸和脯氨酸代谢，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢，柠檬酸循环，甘油磷脂代谢和嘌呤代谢。

此外，基于代谢组学的地骨皮乙素抗糖尿病机制 [68]、夏枯草活性成分（BA-12）抗血管生成作用机制 [69]、黄柏酮抗前列腺癌作用机制 [70]、酸枣仁皂苷 A 治疗失眠作用机制 [71]、黄连总生物碱治疗胃黏膜损伤作用机制 [72]、当归多糖保肝作用机制 [73]、葛根素抗心肌缺血机制 [74] 等研究都取得了较好的研究进展。

2.4 中药安全性相关代谢组学研究

中药同其他药物一样，具有毒效二重性。中药安全性在世界范围内备受关注，对中药的安全性作出准确评价，阐明致毒机制，建立安全、有效的防控方法，对中药现代化和国际化具有重要的现实意义。利用代谢组学技术动态检测生物体

表 2 代谢组学在中药复方作用机制研究中的应用

Tab 2 Application of metabonomics in the study of active mechanism of traditional Chinese medicine compound prescription

研究内容	分析样品	分析技术	生物标志物	作用机制	文献
逍遥散抗抑郁作用机制	大鼠血清	^{1}H-NMR	3-羟基丁酸，乳酸盐，牛磺酸，琥珀酸盐，瓜氨酸等	调节酮体的合成和降解，丁酸代谢，精氨酸生物合成，甘油酯代谢以及牛磺酸和亚牛磺酸代谢	[45]
防己黄芪汤治疗肾病综合征作用机制	大鼠血清、肾组织	^{1}H-NMR	谷氨酰胺，苯丙氨酸，蛋氨酸，丙氨酸，柠檬酸盐等	调节丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，柠檬酸循环，丙酮酸代谢，半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及乙醛和二元酸代谢	[46]
防己黄芪汤治疗肾病综合征作用机制	大鼠血清、尿液	UPLC-ESI-Q-TOF-MS	丙氨酰甘氨酸，2-苯丙氨酸，蛋氨酰基甘氨酸等	调节亚油酸代谢，氰基氨基酸代谢，亚麻酸代谢，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，花生四烯酸代谢和甘油磷脂代谢	[47]
柴胡疏肝散抗抑郁作用机制	大鼠尿液	UPLC-Q-TOF-MS	犬尿喹酸，谷氨酸，脯氨酸等	调节能量代谢，色氨酸代谢，改善骨质流失，提高肝脏解毒功能	[48]
柴胡疏肝散抗抑郁作用机制	大鼠尿液	^{1}H-NMR、UPLC-Q-TOF-MS	谷氨酸，异亮氨酸，左旋多巴等	参与调节酮体合成，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成，缬氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢和糖酵解 / 糖异生的代谢途径	[49]
柴胡疏肝散抗抑郁以及抗肝损伤作用机制	大鼠肝组织	UPLC-Q-TOF-MS	油酸，烟酰胺，4-氨基丁酸等	调节磷脂和胆汁酸代谢	[50]
苓甘五味姜辛汤与干姜治疗感冒哮喘作用机制	大鼠血清、尿液	GC-MS	甘油，甘氨酸，苯甲酸，丁二酸，柠檬酸等	调节能量代谢，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径，磷酸肌醇代谢，抑制氧化应激	[51]
黄连解毒汤对缺血性脑卒中的神经保护作用机制	大鼠血清、脑组织	^{1}H-NMR	亮氨酸，缬氨酸，丙酮酸，天冬氨酸，色氨酸等	改善能量代谢，线粒体代谢，神经递质代谢和氨基酸代谢紊乱	[52]
桃红四物汤治疗冠心病作用机制	人血清	UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS	丁二酰基肉碱，琥珀酸盐，马尿酸盐等	调节脂肪酸代谢，半胱氨酸和蛋氨酸代谢，甘油磷脂代谢，氨基酸代谢	[53]
知柏地黄丸治疗糖尿病肾病作用机制	大鼠血清、尿液、肾组织	^{1}H-NMR	缬氨酸，丙氨酸，蛋氨酸，柠檬酸盐等	抑制葡萄糖和脂质代谢，增强甲胺代谢	[54]
广东凉茶清热解暑机制	大鼠血清	^{1}H-NMR	丙酮酸，乳酸，3-羟基丁酸等	调节能量代谢	[55]
补肺益肾方治疗慢性阻塞性肺病作用机制	大鼠肺组织	UPLC-Q-TOF-MS	亚油酸，苯丙氨酸，白三烯等	调节不饱和脂肪酸代谢，苯丙氨酸代谢，磷脂代谢和花生四烯酸代谢	[56]
十味甘宁丸治疗肝纤维化作用机制	大鼠血清、肝组织	^{1}H-NMR	谷胱甘肽，谷氨酰胺，乳酸盐，天冬氨酸等	抗氧化，修复受损的能量代谢，逆转氨基酸和核酸代谢紊乱	[57]
双黄连注射液解热机制	大鼠血浆	UPLC-Q-TOF-MS	亮氨酸，赖氨酸，3-羟基丁酸，缬氨酸等	调节缬氨酸，亮氨酸和异亮氨酸生物合成，甘油磷脂代谢，酮体合成和降解，胆汁酸生物合成和核黄素代谢	[58]
维胃方抗胃溃疡作用机制	大鼠胃组织	GC-MS	乳酸，苯丙氨酸，亚油酸，花生四烯酸等	调节胃黏膜能量代谢，氨基酸代谢及脂类代谢	[59]
左金丸治疗胃热证作用机制	大鼠尿液、粪便、血清、胃组织	^{1}H-NMR	琥珀酸，柠檬酸，正丁酸，乳酸等	调节三羧酸循环，抗氧化应激，改善肠道菌群代谢紊乱	[60]

内的代谢图谱变化，确定毒性作用靶点、作用过程及生物标志物 [75-76]，已被证明是切实可行的研究策略。

草乌（*Aconitum kusnezoffii* Reichb.）广泛用于风湿性关节炎，疼痛性关节炎和肿瘤 [77-78]。然而，草乌诱导的心脏和中枢神经系统毒性极大地限制了其应用。Yan 等 [79] 通过研究给予草乌后大鼠尿液代谢谱的变化，采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术结合 PCA、PLS 和 OPLS-DA 法鉴定出 13 种重要的代谢物，主要涉及戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、色氨酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、果糖和甘露糖代谢、淀粉和蔗糖代谢以及抗坏血酸和醛酸代谢，故推测这些代谢途径可能是对乌头类药物毒性反应的主要网络。

何首乌（*Polygonum multiflorum* Thunb.）是一种历史悠久的补益类中药，然而，近些年来，关于何首乌引起肝毒性的临床报告最近受到了广泛关注 [80]。由于其肝毒性机制尚不清楚，本课题组对其进行了较为系统的研究。研究表明，对何首乌进

行炮制可降低其毒性，达到增效减毒的目的[81]。

Xing 等[82-83]为研究何首乌生品与炮制品（黑豆汁单蒸制何首乌及拌黑豆九蒸九晒制何首乌）的差异，采用 UPLC-IMS-Q-TOF-MS 技术分析非挥发性有机物（n-VOCs），采用 HS-SPME-GC-MS 和 HS-GC-IMS 技术分析挥发性有机物（VOCs）。发现在何首乌炮制品中，大黄素、反式二苯乙烯苷和顺式二苯乙烯苷等肝毒性化合物含量显著降低[84-88]；而通过调节雌激素受体、抑制促炎细胞因子等方式发挥保肝作用的染料木苷的含量则显著升高[89]。因此，推测拌黑豆九蒸九晒炮制工艺，对于何首乌的“增效减毒”更为有效。

Wang 等[90]制备何首乌的 60% 乙醇提取物（PMPE），采用非靶向代谢组学技术结合受试者操作特征曲线（ROC）分析方法，研究大鼠口服 PMPE 后血浆代谢物的变化。发现 PMPE 诱导的肝损伤组代谢谱与对照组的差异有统计学意义，并鉴定得到 16 个差异代谢产物，主要涉及胆汁酸、脂质和能量代谢，表明 PMPE 引起的肝损伤可能与胆汁淤积和脂质代谢失调有关。

此外，基于代谢组学的天南星毒性机制[91]、蓖麻毒素毒性机制[92]、藜芦肝毒性机制[93]、川乌毒性机制[94]、广防己肾毒性机制[95]等研究也都取得了较好的研究进展。

3 展望

综上所述，代谢组学在中药作用机制研究中发挥了重要作用，但作为一种新兴组学技术，同样面临着一些无可避免的问题。代谢组学数据库的缺乏和分析误差的存在都为代谢组学研究带来了巨大的挑战，此外，在数据分析方面还需要进一步完善[96]。因此，在中药作用机制研究中，代谢组学技术的应用应注意以下几方面：① 将代谢网络的知识与人工智能、数据库检索深入融合，逐步完善并扩大用于化合物识别的代谢物数据库，实现代谢物自动化、智能化的精准鉴定；② 进一步开发灵敏度高、覆盖度广的稳定可靠分析方法，保证实验室内各批次的分析重复性和实验室间数据的可比性，从而提高代谢物检测的准确度和重复性；③ 将随机森林、支持向量机、神经网络等机器学习算法应用于代谢组学数据分析，继续开发快速、高效的数据处理技术；④ 注重与基因组学、转录组学、蛋白质组学等其他组学数据的整合，以便深入阐释生物标志物的分子调控机制。总之，随着技术不断的创新和发展，代谢组学在中药领域的研究将拥有更广阔的前景。

参考文献

[1] 王晓艳，李翔，肖翔，等 . 基于质谱技术对森林脑炎患者血清代谢组学的研究 [J]. 国际检验医学杂志，2022，43（2）：167-171.

[2] 张丽君，王丹，王育娇，等 . 基于气相色谱 - 质谱联用技术的代谢组学在农产品产地溯源中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（6）：2197-2203.

[3] 张宜帆，周曼丽，罗晓欣，等 . 代谢组学在冠心病中医证候中的研究进展 [J]. 中医药通报，2022，21（1）：57-60.

[4] 孙萌，刘伟，刘海霞，等 . 早期冠状动脉粥样硬化患者血浆代谢组学研究 [J]. 中国循环杂志，2022，37（1）：24-30.

[5] 江美芳，高崎，王丹丹 . 基于 LC-MS 代谢组学技术在中药化学成分中的应用 [J]. 中国医药导报，2020，17（25）：133-136.

[6] 汪明明，程海婷，薛明 . 基于 LC-MS 的代谢组学分析流程与技术方法 [J]. 国际药学研究杂志，2011，38（2）：130-136.

[7] 秦昆明，王彬，陈林伟，等 . 代谢组学在中药现代研究的应用与展望 [J]. 中国中药杂志，2014，39（16）：3010-3017.

[8] 郭明星 . 清开灵注射液解热作用代谢组学研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2014.

[9] 李宾，吕蔡 . 代谢组学与泌尿系结石相关研究新进展 [J]. 临床泌尿外科杂志，2022，37（1）：74-79.

[10] 赵珊，王鹏程，冯健，等 . 代谢组学技术及其在中医药研究中的应用 [J]. 中草药，2015，46（5）：756-765.

[11] 刘荣华，俞洪华，殷茜茜，等 . LC-MS 在中药代谢组学中的应用进展 [J]. 亚太传统医药，2021，17（9）：183-191.

[12] 王斯婷，李晓娜，王皎，等 . 代谢组学及其分析技术 [J]. 药物分析杂志，2010，30（9）：1792-1799.

[13] 卢红梅，梁逸曾 . 代谢组学分析技术及数据处理技术 [J]. 分析测试学报，2008，27（3）：325-332.

[14] 吕燕慧，谢磊，陈威，等 . 代谢组学在中医证候中的应用进展 [J]. 中国中药杂志，2022，47（2）：367-375.

[15] Zhao Y，Yuan YC，Bai XL，et al. Multi-mycotoxins analysis in liquid milk by UHPLC-Q-Exactive HRMS after magnetic solid-phase extraction based on PEGylated multi-walled carbon nanotubes [J]. Food Chem，2020，305：125429.

[16] Theodoridis GA，Gika HG，Want EJ，et al. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling：a review [J]. Anal Chim Acta，2012，711：7-16.

[17] 武冬 . 基于代谢组学的抑郁症患者粪便研究 [D]. 重庆：重庆医科大学，2016.

[18] 段元元 . 基于代谢组学与网络药理学探讨清肺降霾方防治 $PM_{2.5}$ 相关肺损伤的机制研究 [D]. 苏州：中国中医科学院，2021.

[19] 久欣，张慧文，刘宏，等 . 化学计量学方法在中药质量标志物中的应用 [J]. 中成药，2021，43（12）：3416-3421.

[20] 尹茜茜，马峥玲，涂思洁，等 . 基于网络药理学探讨山

药 - 熟地黄治疗痴呆的作用机制 [J]. 山西中医，2022，38（3）：62-65.
[21] 戴晶，商锰男，地娜拉·加力肯，等 . 中医药治疗原发性高血压病的代谢组学研究进展 [J]. 江苏中医药，2021，53（11）：81-85.
[22] 赵梦竹，吕双宏，王恒和 . 基于组学技术的冠心病血瘀证候研究进展 [J]. 中医药学报，2021，49（9）：105-110.
[23] 毛逸斐 . 中医药科技期刊国际化发展策略分析 [J]. 出版与印刷，2021，122（3）：59-65.
[24] 谢静，李云鹃，缪兴龙，等 . 基于代谢组学技术的中药复方药效物质基础与作用机制研究 [J]. 药物评价研究，2020，43（7）：1439-1445.
[25] 郭慧，崔扬，王秋红，等 . 基于代谢组学技术的中药复方研究近况 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（1）：213-219.
[26] 张居卫，张海英 . 多西他赛联合顺铂二线治疗老年人晚期非小细胞肺癌的有效性和安全性分析 [J]. 中国基层医药，2022，29（3）：417-422.
[27] 洪敏洁 . 门氏定喘汤加味联合舒利迭治疗肺脾气虚型 COPD 稳定期的临床疗效观察 [D]. 太原：山西中医药大学，2020.
[28] Li J，Gao W，Gao JN，et al. Metabolomics reveal the protective effect of Farfarae Flos against asthma using an OVA-induced rat model [J]. RSC Advances，2017，7（63）：39929-39939.
[29] Yu ST，Li J，Gao W，et al. Uncovering the anticancer mechanism of petroleum extracts of Farfarae Flos against Lewis lung cancer by metabolomics and network pharmacology analysis [J]. Biomed Chromatogr，2020，34（9）：e4878.
[30] 陈晶，张博华 . 黄芪、大黄的抗肾纤维化作用研究进展 [J]. 中医药学报，2011，39（6）：101-104.
[31] Zhang ZH，Wei F，Vaziri ND，et al. Metabolomics insights into chronic kidney disease and modulatory effect of rhubarb against tubulointerstitial fibrosis [J]. Sci Rep，2015，5：14472.
[32] Han YQ，Li YX，Wang YZ，et al. Comparison of fresh，dried and stir-frying gingers in decoction with blood stasis syndrome in rats based on a GC-TOF/MS metabolomics approach [J]. J Pharm Biomed Anal，2016，129：339-349.
[33] Jiang YX，Wen JX，Zhang WW，et al. Metabolomics coupled with integrative pharmacology reveals the therapeutic effect of l-borneolum against cerebral ischaemia in rats [J]. J Pharm Pharmacol，2020，72（9）：1256-1268.
[34] Shen J，Pu ZJ，Kai J，et al. Comparative metabolomics analysis for the compatibility and incompatibility of kansui and licorice with different ratios by UHPLC-QTOF/MS and multivariate data analysis [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2017，1057：40-45.
[35] Zhao YY，Li HT，Feng YL，et al. Urinary metabonomic study of the surface layer of Poria cocos as an effective treatment for chronic renal injury in rats [J]. J Ethnopharmacol，2013，148（2）：403-410.
[36] Zheng CP，Han L，Wu SH. A metabolic investigation of anticancer effect of G. glabra root extract on nasopharyngeal carcinoma cell line，C666-1 [J]. Mol Biol Rep，2019，46（4）：3857-3864.
[37] Li MH，Feng X，Deng Ba DJ，et al. Hepatoprotection of Herpetospermum caudigerum Wall. against CCl_4-induced liver fibrosis on rats [J]. J Ethnopharmacol，2019，229：1-14.
[38] Liu R，Huang Q，Duan JA，et al. Peptidome characterization of the antipyretic fraction of Bubali Cornu aqueous extract by nano liquid chromatography with orbitrap mass spectrometry detection [J]. J Sep Sci，2017，40（2）：587-595.
[39] Li AP，Yang L，Cui T，et al. Uncovering the mechanism of Astragali Radix against nephrotic syndrome by intergrating lipidomics and network pharmacology [J]. Phytomedicine，2020，77：153274.
[40] 方子昂，程靖，王文艳，等 . 新生化颗粒联合透明质酸钠对宫腔粘连患者的疗效及血清 TIMP-1、PDGF、MMP-9 的影响 [J]. 中国妇产科临床杂志，2019，20（5）：401-403.
[41] Pang HQ，Yue SJ，Tang YP，et al. Integrated metabolomics and network pharmacology approach to explain possible action mechanisms of Xin-Sheng-Hua Granule for treating Anemia [J]. Front Pharmacol，2018，9：165.
[42] 崔霞，徐晓梅 . 茵陈蒿汤治疗慢性乙型病毒性肝炎的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育，2022，20（6）：206-208.
[43] Sun H，Yang L，Li MX，et al. UPLC-G2Si-HDMS untargeted metabolomics for identification of metabolic targets of Yin-Chen-Hao-Tang used as a therapeutic agent of dampness-heat jaundice syndrome [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2018，1081-1082：41-50.
[44] Sun H，Zhang AH，Song Q，et al. Functional metabolomics discover pentose and glucuronate interconversion pathways as promising targets for Yang Huang syndrome treatment with Yinchenhao Tang [J]. RSC Adv，2018，8（64）：36831-36839.
[45] Liu XJ，Wang YZ，Lv M，et al. Serum metabolomics reveals compatibility rules of the antidepressant effects of Xiaoyaosan and its efficacy groups [J]. Psychiatry Res，2021，299：113827.
[46] Zhang WN，Yang L，He SS，et al. Metabolomics coupled with integrative pharmacology reveal the protective effect of Fangji Huangqi Decoction against adriamycin-induced rat nephropathy model [J]. J Pharm Biomed Anal，2019，174：525-533.
[47] Liu X，Zhou QG，Zhu XC，et al. Screening for potential active components of Fangji Huangqi Tang on the treatment of nphrotic syndrome by using integrated metabolomics based on “Correlations Between Chemical and Metabolic Profiles” [J]. Front Pharmacol，2019，10：1261.
[48] Su ZH，Li SQ，Zou GA，et al. Urinary metabonomics

study of anti-depressive effect of Chaihu-Shu-Gan-San on an experimental model of depression induced by chronic variable stress in rats [J]. J Pharm Biomed Anal，2011，55（3）：533-539.

[49] Jia HM，Su ZH，Long W，et al. Metabonomics combined with UPLC-MS chemical profile for discovery of antidepressant ingredients of a Traditional Chinese Medicines Formula，Chaihu-Shu-Gan-San [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2013，2013：487158.

[50] Jia HM，Yu M，Ma LY，et al. Chaihu-Shu-Gan-San regulates phospholipids and bile acid metabolism against hepatic injury induced by chronic unpredictable stress in rat [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2017，1064：14-21.

[51] Ran S，Sun FF，Song Y，et al. The study of dried ginger and Linggan Wuwei Jiangxin Decoction treatment of cold asthma rats using GC-MS based metabolomics [J]. Front Pharmacol，2019，10：284.

[52] Wang PR，Wang JS，Yang MH，et al. Neuroprotective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Decoction on ischemic stroke rats revealed by ^{1}H NMR metabolomics approach [J]. J Pharm Biomed Anal，2014，88：106-116.

[53] Tao TQ，He T，Mao HM，et al. Non-targeted metabolomic profiling of coronary heart disease patients with Taohong Siwu Decoction treatment [J]. Front Pharmacol，2020，11：651.

[54] Zhao LC，Gao HC，Zhao YX，et al. Metabonomic analysis of the therapeutic effect of Zhibai Dihuang Pill in treatment of streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. J Ethnopharmacol，2012，142（3）：647-656.

[55] You R，Xu ZB，Hu SQ，et al. Characterization of temporary metabolic changes following Cantonese herbal tea intervention [J]. Phytother Res，2012，26（7）：1097-1102.

[56] Yang LP，Li JS，Li Y，et al. Identification of metabolites and metabolic pathways related to treatment with Bufei Yishen Formula in a rat COPD model using HPLC Q-TOF/MS [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2015，2015：956750.

[57] Feng X，Li MH，Xia J，et al. Tibetan medical formula Shi-Wei-Gan-Ning-Pill protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis-an NMR-based metabolic profiling [J]. Front Pharmacol，2018，9：965.

[58] Gao XY，Guo MX，Li Q，et al. Plasma metabolomic profiling to reveal antipyretic mechanism of Shuang-huang-lian injection on yeast-induced pyrexia rats [J]. PLoS One，2014，9（6）：e100017.

[59] 彭树灵，刘晓伟，张真瑞，等 . 从代谢组学的角度探讨维胃方对大鼠实验性胃溃疡的疗效机制 [J]. 中国中西医结合杂志，2010，30（10）：1073-1077.

[60] 周祥羽 . 左金丸治疗胃热证作用机制及血清药物化学研究 [D]. 广州：广东药科大学，2017.

[61] 王露露，李冰，王圳伊，等 . 基于“整体观”系统生物学技术在中药研究中的应用进展 [J]. 中草药，2020，51（19）：5053-5064.

[62] 陈涛，李卫，王杨，等 . 高尿酸血症的患病情况及相关因素分析 [J]. 中华临床医师杂志（电子版），2012，6（13）：3526-3529.

[63] 陈光亮，徐叔云 . 高尿酸血症研究进展 [J]. 中国药理学通报，2003，19（10）：1088-1092.

[64] 王明星 . 荷叶碱对高尿酸血症状态下动物肾保护作用及其机制的研究 [D]. 南京：南京大学，2015.

[65] 王涛 . 薯蓣皂苷对高尿酸血症的治疗作用 [A]// 中华中医药学会糖尿病分会全国中医药糖尿病大会（第十九次）资料汇编 [C]. 2018：229-230.

[66] Wang LM，Wang P，Teka T，et al. 1H NMR and UHPLC/ Q-Orbitrap-MS-Based metabolomics combined with 16S rRNA gut microbiota analysis revealed the potential regulation mechanism of nuciferine in hyperuricemia rats [J]. J Agric Food Chem，2020，68（47）：14059-14070.

[67] Tan Y，Wang LM，Gao J，et al. Multiomics integrative analysis for discovering the potential mechanism of dioscin against hyperuricemia mice [J]. J Proteome Res，2021，20（1）：645-660.

[68] Li YY，Stewart DA，Ye XM，et al. A metabolomics approach to investigate Kukoamine B-a potent ntural product with anti-diabetic properties [J]. Front Pharmacol，2019，9：1575.

[69] Cui HR，Guo WB，Zhang BB，et al. BA-12 inhibits angiogenesis via glutathione metabolism activation [J]. Int J Mol Sci，2019，20（16）：4062.

[70] Xie J，Zhang AH，Qiu S，et al. Identification of the perturbed metabolic pathways associating with prostate cancer cells and anticancer affects of obacunone [J]. J Proteomics，2019，206：103447.

[71] Wang XJ，Yang B，Zhang AH，et al. Potential drug targets on insomnia and intervention effects of Jujuboside A through metabolic pathway analysis as revealed by UPLC/ESI-SYNAPT-HDMS coupled with pattern recognition approach [J]. J Proteomics，2012，75（4）：1411-1427.

[72] 邹忠杰，龚梦鹃，谢媛媛，等 . 黄连总生物碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤保护作用的代谢组学研究 [J]. 中华中医药杂志，2013，28（3）：807-810.

[73] Hua YL，Xue WX，Zhang M，et al. Metabonomics study on the hepatoprotective effect of polysaccharides from different preparations of Angelica sinensis [J]. J Ethnopharmacol，2014，151（3）：1090-1099.

[74] Zhou YZ，Li MR，Song J，et al. The cardioprotective effects of the new crystal form of puerarin in isoproterenol-induced myocardial ischemia rats based on metabolomics [J]. Sci Rep，2020，10（1）：17787.

[75] 温艳清，王琳，赵楠，等 . 代谢组学技术在中药毒性机制及解毒机制研究中的应用 [J]. 中国药物警戒，2018，15（5）：280-285.

[76] 王思雨，王英姿，张景珍，等 . 代谢组学在有毒中药中的应用研究进展 [C]// 2017 年第七届药物毒理学年会论文集，2017：224-229.

[77] 陈扬，王昭懿，代一航，等 . 基于网络药理学及分子对接的川乌、草乌配伍治疗类风湿性关节炎的机制研究 [J]. 世界中西医结合杂志，2021，16（6）：1036-1043.
[78] 魏巍 . 乌头碱降解产物化学成分及生物活性研究 [D]. 长春：吉林大学，2011.
[79] Yan Y，Zhang AH，Dong H，et al. Toxicity and detoxification effects of herbal caowu via ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry metabolomics analyzed using pattern recognition method [J]. Pharmacogn Mag，2017，13（52）：683-692.
[80] Zhang CE，Niu M，Li Q，et al. Urine metabolomics study on the liver injury in rats induced by raw and processed Polygonum multiflorum integrated with pattern recognition and pathways analysis [J]. J Ethnopharmacol，2016，194：299-306.
[81] 张超，张瑞晨，孙震晓 . 何首乌生品与炮制品对大鼠肝脏的毒理学研究 [J]. 中药材，2013，36（9）：1416-1419.
[82] Xing YC，Yan Z，Li YH，et al. An effective strategy for distinguishing the processing degree of Polygonum multiflorum based on the analysis of substance and taste by LC-MS，ICP-OES and electronic tongue [J]. J Pharm Biomed Anal，2021，205：114328.
[83] Xing YC，Yu ZY，Hu XH，et al. Characterization of volatile organic compounds in Polygonum multiflorum and two of its processed products based on multivariate statistical analysis for processing technology monitoring [J]. J Chromatogr A，2022，1680：463431.
[84] Liu Y，Wang WP，Sun MY，et al. Polygonum multiflorum-induced liver injury：clinical characteristics，risk factors，material basis，action mechanism and current challenges [J]. Front Pharmacol，2019，10：1467.
[85] Liu Y，Wang Q，Yang JB，et al. *Polygonum multiflorum* Thunb.：a review on chemical analysis，processing mechanism，quality evaluation，and hepatotoxicity [J]. Front Pharmacol，2018，9：364.
[86] Lin LF，Ni BR，Lin HM，et al. Traditional usages，botany，phytochemistry，pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.：a review [J]. J Ethnopharmacol，2015，159：158-183.
[87] 贺兰芝，尹萍，孟雅坤，等 . PPAR-γ 依赖的何首乌免疫性特异质肝损伤机制研究 [J]. 药学学报，2017，52（7）：1027-1032.
[88] 张乐，柏兆方，李春雨，等 . 制首乌中顺式二苯乙烯苷转化量与特异质肝损伤的相关性研究 [J]. 药学学报，2017，52（7）：1041-1047.
[89] Islam A，Islam MS，Uddin MN，et al. The potential health benefits of the isoflavone glycoside genistin [J]. Arch Pharm Res，2020，43（4）：395-408.
[90] Wang LM，Wang ZD，Xing YC，et al. Biomarkers and mechanism analysis for polygoni multiflori radix preparata-induced liver injury by UHPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：7677392.
[91] Dong G，Wang JS，Guo PP，et al. Toxicity assessment of Arisaematis Rhizoma in rats by a ^{1}H NMR-based metabolomics approach [J]. Mol Biosyst，2015，11（2）：407-417.
[92] Wei ZH，Qian QQ，Dong X，et al. Metabolomic approach to understand the acute and chronic hepatotoxicity of Veratrum nigrum extract in mice based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Toxicol Mech Methods，2017，27（9）：687-696.
[93] Wang XJ，Wang HY，Zhang AH，et al. Metabolomics study on the toxicity of aconite root and its processed products using ultraperformance liquid-chromatography/electrospray-ionization synapt high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and ingenuity pathways analysis [J]. J Proteome Res，2012，11（2）：1284-1301.
[94] 梁琦，倪诚，谢鸣，等 . 广防己的肾毒性及代谢组学研究 [J]. 中西医结合学报，2009，7（8）：746-752.
[95] 龚雪，周东，洪桢 . 代谢组学在癫痫相关研究中的应用现状 [J]. 医学综述，2021，27（11）：2081-2086.
[96] 王清腾，金映筑，罗振华，等 . 代谢组学在冠心病中的研究进展 [J]. 心血管病学进展，2021，42（9）：812-815.

（收稿日期：2022-10-07；修回日期：2022-11-09）

研究论文

不同程度慢性脑低灌注导致小鼠脑白质损伤和认知功能改变的研究

滕李利[1, 2]，钟奕[1, 2]，戚舜尧[1, 2]，孙乐[1, 2]，马培[1, 2*]，许利嘉[1, 2]，肖培根[1, 2]（1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所，北京 100193；2. 国家教育部中草药物质基础与资源利用重点实验室，北京 100193）

摘要：目的 探究小鼠颈总动脉狭窄（BCAS）模型中不同微线圈长度对小鼠脑白质影响，并初步探究对小鼠认知功能和小胶质细胞的影响。**方法** 用不同长度的微线圈制备 BCAS 模型小鼠，5 周后通过各组小鼠的脏器比评估模型对脏器的影响，用旷场、新物体识别、水迷宫等 3 个行为学实验评估各组小鼠的学习认知能力，用 LFB 染色及免疫组化评估模型小鼠脑白质损伤及小胶质细胞功能的改变，用实时荧光定量（qRT-PCR）检测小鼠脑白质中 *Il-1β*、*Tnf-α*、*Bdnf*、*Gdnf* 的表达。**结果** BCAS 模型并未对小鼠脏器发育造成明显影响，4.5 mm 和 5.5 mm 微线圈显著影响慢性脑低灌注情况，造成明显的学习行为认知障碍。LFB 染色显示脑白质组织疏松程度、纤维排列情况和空泡现象随线圈变长而加重。iba-1 免疫组化显示阳性小胶质细胞数随线圈变长而增多。qRT-PCR 结果显示随线圈变长，炎症因子 *Il-1β*、*Tnf-α* 在基因水平的表达上升，而神经营养因子 *Bdnf*、*Gdnf* 在基因水平的表达下降。**结论** 4.5 mm 的弹簧微线圈能够造成 C57BL/6J 小鼠适中的脑白质损伤，引起认知功能改变和小胶质活化。该模型适用于进一步研究慢性脑低灌注引起血管性认知障碍的发病机制及药效评估。

关键词：慢性脑低灌注；脑白质；认知损伤；小胶质细胞

中图分类号：R743 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1720-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.005

Effect of different degrees of chronic cerebral hypoperfusion on white matter lesions and cognitive function changes in mice

TENG Li-li[1, 2], ZHONG Yi[1, 2], QI Shun-yao[1, 2], SUN Le[1, 2], MA Pei[1, 2*], XU Li-jia[1, 2], XIAO Pei-gen[1, 2] (1. *Institute of Medicinal Plant Development*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Peking Union Medical College*, *Beijing* 100193; 2. *Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine*, *Ministry of Education*, *Beijing* 100193)

Abstract: Objective To determine the potential effect of different lengths of microcoils on mouse white matter lesions, microglial activation, and cognitive dysfunction. **Methods** Microcoils of different lengths were used to induce three models of bilateral CCA stenosis (BCAS). The effect of BCAS on organ/body weight ratio was evaluated after 5 weeks. The cognitive ability was estimated by open field test, novel object recognition test and Morris water maze test. Luxol Fast Blue (LFB) and Iba-1 immunohistochemistry staining were performed to assess the white matter demyelination and microglial activation. The levels of *Il-1β, Tnf-α, Bdnf,* and *Gdnf* in the white matter were detected by qRT-PCR. **Results** There was no significant difference in organ/body weight ratio between BCAS model mice

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No. 82174046）；海南省院士创新平台科研专项；中国医学科学院医学与健康科技创新工程（No. 2021-I2M-1-031）。

作者简介：滕李利，女，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：tll10969@163.com *通信作者：马培，女，副研究员，主要从事中药药理学研究，email：pma@implad.ac.cn

and normal mice. Microcoils of 4.5 and 5.5 mm caused remarkable chronic cerebral hypoperfusion and cognitive dysfunction in the BCAS mice. Based on LFB and immunohistochemistry staining, white matter demyelination, nerve fiber integrity and arrangement, vacuolar lesion, and microglial activation were observed in BCAS mice, and aggravated by longer microcoils. The expressions of inflammatory cytokines such as *Il-1β* and *Tnf-α* were increased, while the expressions of neurotrophic factors such as *Bdnf* and *Gdnf* were decreased in the BCAS groups at the gene level. **Conclusion** Microcoil of 4.5 mm may induce significant white matter injury, cognitive dysfunction, and microglial activation in mice, which may be a suitable model for the evaluation of etiopathogenesis and pharmacodynamics of vascular cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion.

Key words: chronic cerebral hypoperfusion; white matter; cognitive impairment; microglia

血管性认知障碍（vascular cognitive impairment，VCI）主要指由血管危险因素（高血压、高胆固醇、糖尿病）和脑血管疾病（白质疏松、慢性脑缺血、脑梗死和脑出血等）引起的广泛的认知障碍，包括从轻度认知障碍到缺血性和出血性中风引起的血管性痴呆，以及血管因素单独或合并神经退行性疾病，包括阿尔茨海默病及其相关痴呆 [1-2]，VCI 至少占所有痴呆诊断的 20% ～ 40%。

多种脑血管病因可引起 VCI，VCI 早期表现为白质损伤，后期病理影像表现为脑腔隙微梗死和微出血 [3]。目前，由于缺乏安全有效的治疗方法，白质病变的治疗多以预防为主。VCI 最初的动物模型以大鼠为主，缺少小鼠的模型。由于 C57BL/6 品系小鼠的后交通动脉存在发育不良，因此有日本学者首先通过手术将 0.18 mm 的弹簧微线圈套在小鼠双侧颈总动脉上，造成小鼠颈总动脉狭窄（bilateral CCA stenosis，BCAS），术后小鼠脑部出现血液灌注不足、脑组织缺氧等情况，因此成功构建了皮质下缺血的血管性痴呆模型，该学者同时还考察了 0.16 ～ 0.22 mm 的不同内径对慢性脑低灌注的影响 [4]。BCAS 模型小鼠在术后 3 d 即可出现脑白质区受损，术后 15 d 有显著病理改变，术后 30 d 左右出现显著的慢性脑低灌注造成的脑白质损伤及各项行为能力障碍 [5]，同时造模过程无明显视觉和大脑灰质损伤，术后脑血流量持续降低 [6-7]。但本模型也有一些不足，如海马萎缩、炎症激活、认知障碍和记忆力减退的表现需要较长时间才可以出现等问题 [8]。在以往研究过程中，学者多采用固定微线圈长度而改变微线圈内径的方式来改变 BCAS 模型的严重程度，而微线圈长度影响 BCAS 小鼠出现认知障碍表型快慢的研究较少报道。

本实验在 BCAS 方法 [9] 上进行改良，建立脑白质损伤导致的 VCI 模型，在此基础上探究不同微线圈长度对小鼠认知功能和小胶质活化的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 49 只，体质量（24±2）g [斯贝福（北京）生物技术有限公司，饲养于中国医学科学院药用植物研究所动物实验中心]。自由进食饮水，适应性饲养 7 d。本实验获得中国医学科学院药用植物研究所伦理委员会批准（SLXD-20220314025）。

1.2 试药

固蓝染液（武汉赛维尔生物有限公司）；戊巴比妥钠（天津一方科技有限公司）；多聚甲醛（北京索莱宝科技有限公司）；Iba-1 抗体（美国 CST 公司，货号 #17198）；TranZol Up Plus RNA kit、TransScipt All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（One-Step gDNA Removal）、PerfectStart Green qPCR SuperMix 试剂盒（北京全式金生物科技有限公司）；引物 *Il-1β*（DMM931848）、*Tnf-α*（DMM445781）、*Bdnf*（DMM358751）、*Gdnf*（DMM162377）、*Gapdh*（DMM1000028）（上海杏园瑞民生物工程有限公司）。

1.3 仪器

显微弹簧线圈（日本 SUZUKI 公司琴钢丝，内径 0.18 mm，螺距 0.5 mm）；3DHISTECH P250 FLASH（3DHISTECH）；Supermaze 动物行为学分析软件（上海欣软信息科技有限公司）；Veriti 96 孔热循环仪（美国赛默飞世尔科技公司）；CFX96 实时定量 PCR 仪（美国伯乐公司）。

2 方法

2.1 分组及 BCAS 造模

C57BL/6J 小鼠随机分为对照组（C 组）及 3 个 BCAS 模型组（M1、M2、M3 组，分别采用长度 5.5 mm、4.5 mm 和 3.5 mm 的弹簧线圈），每组 7 只。小鼠术前禁食 12 h，腹腔注射 80 mg • kg $^{-1}$ 戊巴比妥钠麻醉，颈部正中切开，逐层钝性分离两侧肌肉、两侧迷走神经和颈总动脉，在颈总动

脉的近、远端各放置 1 条 4-0 丝线，将弹簧微线圈以螺旋转入方式固定于一侧颈总动脉上，用生理盐水浸润无菌棉球覆盖切口 30 min，再用相同方法固定另一侧，注意不要损伤颈动脉，术后缝合消毒。4 周后开始行为学检测。

2.2 BCAS 模型对小鼠认知能力的影响

2.2.1 旷场实验 小鼠在避光、安静的旷场实验环境中适应 30 min，随后将其放入 50 cm×50 cm×50 cm 的实验箱中。每只小鼠适应箱内环境 1 min，随后摄像头系统记录并分析小鼠 5 min 内的运动信息和路程。

2.2.2 新物体识别实验 在一个 45 cm×45 cm×45 cm 的正方形测试箱内，利用小鼠探索新物体的天性评价其记忆能力。实验前 3 日为适应期，每只鼠每日适应箱体环境 5 min。第 4 日正式实验，由间隔 30 min 的两个阶段组成。熟悉期将两个完全相同的物体放入测试箱对角，记录小鼠 5 min 内对两个物体的探索时间。鼻尖与物体的距离≤ 2 cm 时即为小鼠的探索阶段。30 min 后进入测试期。将熟悉期的一个物体换成大小相近、但形状颜色不同的新物体，记录 5 min 内小鼠对新物体和已知熟悉物体的探索时间。

采用辨别指数（discrimination index，DI）评价数据，DI（%）=（新物体探索时间－熟悉物体探索时间）/（新物体探索时间＋熟悉物体探索时间）×100%。DI 越大，小鼠对新物体的探索程度越高，学习能力越好。

2.2.3 Morris 水迷宫实验 圆形迷宫直径 100 cm，高 40 cm，水深 25.5 cm，水温（20±2）℃。迷宫均分为 4 个象限，放置一个直径 6 cm，高 24 cm 平台作为逃离水环境的唯一途径。

实验前 5 日为定位航行阶段，每日 2 次，以小鼠入水至找到平台的时间为一次实验的潜伏逃逸期，找到平台则让其停留 3 s，若总检测时间 90 s 内未找到平台，潜伏期记为 90 s，人工引导至平台停留 20 s。第 6 日撤除平台行空间探索阶段。记录小鼠 90 s 内穿越原平台象限动作（次数、时间、游程）等指标，作为评价标准。

2.3 Luxol Fast Blue（LFB）染色

小鼠心脏灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛溶液，石蜡包埋脑组织，切 4 μm 片。二甲苯脱蜡，乙醇梯度水化。LFB 染液 60 ℃浸泡 4 h，70% 乙醇和碳酸锂溶液依次分化。重复以上步骤，直到神经髓鞘呈亮蓝色。切片脱水后，树脂封片，正置光学显微镜下观察并拍照。

2.4 Iba-1 免疫组化染色

石蜡切片烤片、脱蜡、水化；热修复后 3% H_2O_2 室温孵育 10 min；PBS 洗后擦干；37 ℃ 血清封闭 10 min；滴加 Iba-1 一抗 4 ℃过夜，37 ℃ 二抗反应 30 min，DAB 显色，苏木素复染后脱水封片；镜检并拍照。

2.5 mRNA 表达量检测

称取脑组织 10 ～ 20 mg，加入 TranZol 裂解液 0.7 mL。按 TranZol Up Plus RNA 试剂盒说明书提取总 RNA。检测纯度和浓度后，按 TransScipt All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒说明书进行反转录反应。按 PerfectStart Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书进行 qRT-PCR。以 *Gapdh* 为内参基因，mRNA 相对表达量按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

2.6 统计学分析

所有实验数据以均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差（ANOVA）分析，方差齐时采用 LSD-*t* 检验，方差不齐时采用 Dunnett’s T3 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义，采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析，使用 GraphPad Prism 6 软件制图。

3 结果

3.1 小鼠的大体观察

术后苏醒小鼠均可正常活动。实验期各组间体重变化趋势一致（见图 1A），差异无统计学意义。4 ～ 5 周体重有整体下降趋势，推测由于行为学测试体力消耗导致。脏器的重量与其体重之比值，可反应脏器受损情况。实验结束后，取脏器称重并计算脏器比。如图 1B 所示，小鼠心、脾、胰、肝、肾、大脑脏器比的组间差异无统计学意义。

3.2 BCAS 对小鼠认知能力的影响

3.2.1 旷场实验 如图 2A 所示，第 6 周时各组间总路程差异无统计学意义，说明 BCAS 造模不会影响小鼠自主活动能力，为后续实验的可行性打下基础。

3.2.2 新物体识别实验 如图 2B 所示，熟悉期内小鼠对两个物体无明显偏好，探索时间的组间差异没有统计学意义，表明可进行后续实验。测试期内，模型 M1 和 M3 组与正常组相比，DI 指数下降但差异无统计学意义（$P > 0.05$）；模型 M2 组 DI 指数显著下降（$P < 0.05$），数值为负，表明该组小鼠在熟悉期和测试期两个阶段时间尺度上的记忆能力出现损害，无法区分熟悉物体和新物体，未对旧物体形成深刻记忆，学习能力较差。

3.2.3 水迷宫实验 如图 3A 所示，定位航行期各组小鼠寻找平台所用的时间（逃逸期）随每日训练逐渐减少。与正常组相比，3 个模型组逃逸期始终较长。M1 组逃逸期前 3 日始终比 M2、

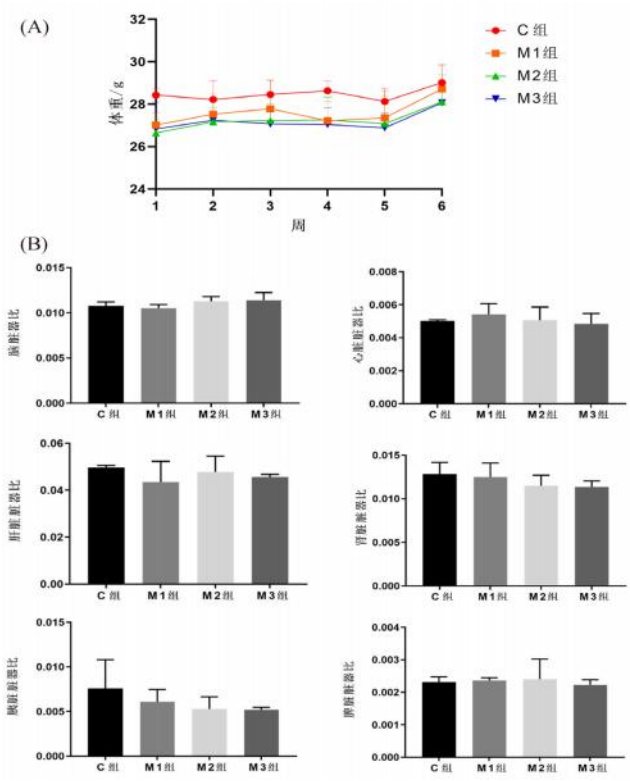


图 1　小鼠大体情况（n = 7）

Fig 1　General observation of mice（n = 7）

A. 体重（body weight）；B. 脏器比（organ ratio）

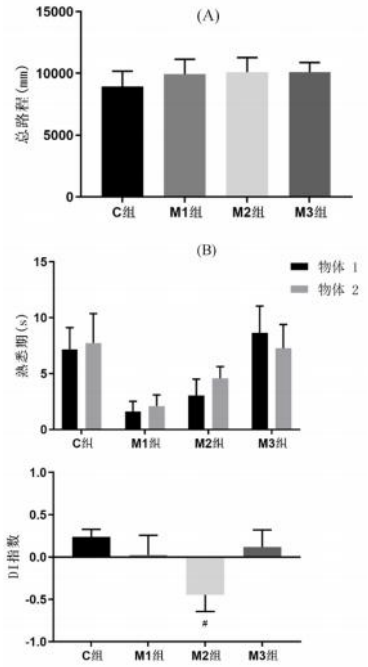


图 2　BCAS 手术对小鼠运动能力及和新旧物体记忆能力的影响（n = 7）

Fig 2　Effect of BCAS operation on the athletic and cognitive ability in mice（n = 7）

A. 旷场实验（open filed test）；B. 新物体识别实验（new object recognition test）

注（Note）：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$（Compared with the control group，$^{\#}P < 0.05$）。

M3 组少，后 3 日变化程度不大，说明 M1 组学习能力未随时间变化。M2、M3 组小鼠有逐渐学习倾向，后 3 日 M2 组学习倾向比 M3 组小。

图 3B 表明，与正常组相比，空间探索期间模型组小鼠潜伏期明显增长，而进入平台次数、进入目标象限次数、目标象限持续时间、平均速度等指标明显减少。综合几组指标，与正常组相比，M2 组小鼠具有较明显的学习行为能力障碍，M1 组小鼠由于漂浮不动、时游时停导致平均速度显著变缓。

与对照组相比，模型小鼠空间探索期运动轨迹散乱，目标模糊，在目标象限活动较少；M1 组在目标象限活动占比最少，M2 组次之，M3 组最多。表明 BCAS 小鼠无法记住平台的位置（见图 3C）。

3.3　BCAS 对小鼠胼胝体髓鞘的损伤

LFB 染色检测髓鞘的形态结构和病理损伤。图 4A 显示：对照组髓鞘蓝染清晰，排列紧密，无脱髓鞘改变；3 个模型组小鼠中，M1 组小鼠髓鞘着色最浅，髓鞘纤维排列最疏松，纤维间质间隙增大、液泡形成；M2 组小鼠着色次之，排列较为稀疏；M3 组小鼠着色最深，排列相对紧密。经阳性细胞占比统计比较，提示 M1、M2 组小鼠存在明显脱髓鞘变化（见图 4B）。

3.4　BCAS 影响小鼠小胶质细胞的活化

Iba-1 免疫组化结果显示：对照组小鼠未见明显小胶质细胞增生；BCAS 组小鼠可见小胶质细胞增生，M1 组小鼠小胶质细胞增生明显，M2 组小鼠次之，M3 组小鼠最少（见图 5）。

3.5　BCAS 影响小鼠脑内炎症因子及神经营养因子相关基因表达

与正常组相比，模型组小鼠脑内神经炎症相关基因 *Il-1β*、*Tnf-α* 表达均有显著性增加，脑内神经营养因子相关基因 *Bdnf*、*Gdnf* 的表达均有不同程度的下调，其中 M1 和 M2 组最为显著（见图 6）。

4　讨论

常用的 VCI 动物模型多见于大鼠，例如大鼠双侧颈动脉闭塞法（BCAO），大鼠四血管闭塞法（4-VO 法）等 [10]。但以上方法存在不可忽视的缺点，包括可造成较高的大鼠死亡率，伤害视束，实验周期较长 [11]。针对小鼠的 VCI 模型较少，以 BCAS 法为主。C57BL/6J 品系小鼠后交通动脉不发达，血供代偿机制受限，可以保持低灌注状态，可以通过不同微弹簧内径调控脑血流，选择性损伤或保留脑区，是目前最适用于研究的模型之一 [12]。血管变化和随后的低灌注被认为是 VCI 中白质损伤的主要原因 [1]。以往采用此模型的研究中，最大的差异在于对弹簧圈直径的选择。因没有完全阻断颈总动脉，残余血量会直接影响到动物的损伤程度和死

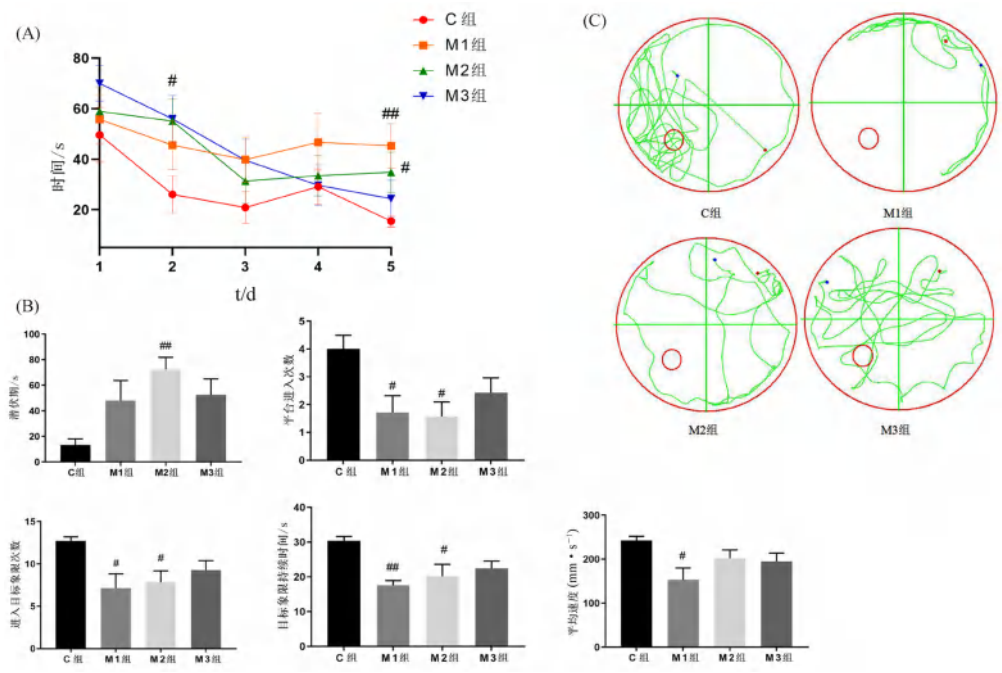


图 3 BCAS 手术对小鼠学习认知行为的影响（$n = 7$）

Fig 3 Effect of BCAS operation on cognitive behavior in mice（$n = 7$）

A. 定位航行期逃逸期（navigation）；B. 空间探索期（spatial probe period）；C. 空间探索期运动轨迹图（motion trajectory diagram in spatial probe period）

注（Note）：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

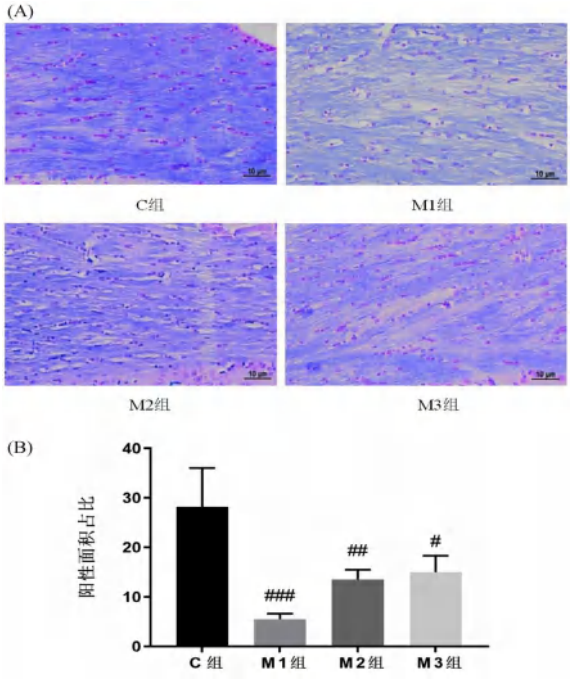


图 4 小鼠胼胝体髓鞘 LFB 染色（×200）

Fig 4 LFB staining of myelin sheath of mouse corpus callosum（×200）

注：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

亡率。日本学者最初提及 3 种弹簧，长度均为 2.5 mm，内径分别为 0.16、0.18、0.20 mm[4]。0.16 mm 弹簧狭窄程度最重，死亡率最高；而存活的模型严

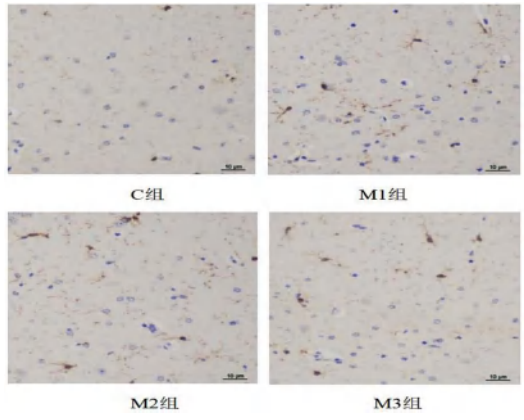


图 5 Iba-1 免疫组化染色评价小胶质细胞增生（×200）

Fig 5 Evaluation of microglia proliferation by immunohistochemical staining of Iba-1（×200）

重程度最重，30 d 时除典型白质受损外也有海马等部位的损伤出现。而 0.18 mm 弹簧，因较低的死亡率和较适中的造模程度，而成为当前 BCAS 模型最常用的弹簧规格。但目前针对造模的关键因素微线圈长度——在造成不同脑部位选择性损伤的研究较少。而微线圈长度，同微线圈内径一样，也会对颈总动脉和分支血管残余血流量造成直接影响。此外，BCAS 方法手术过程较为复杂，对手术技能考验较大，微线圈长度过长易造成小鼠死亡，而太短会导致 BCAS 模型造模失败。基于此，本文在前期实验的基础上设置 3 个模型组，旨在讨论引起认知障碍的 BCAS 模型中微线圈缠绕在血管上的最佳长度。

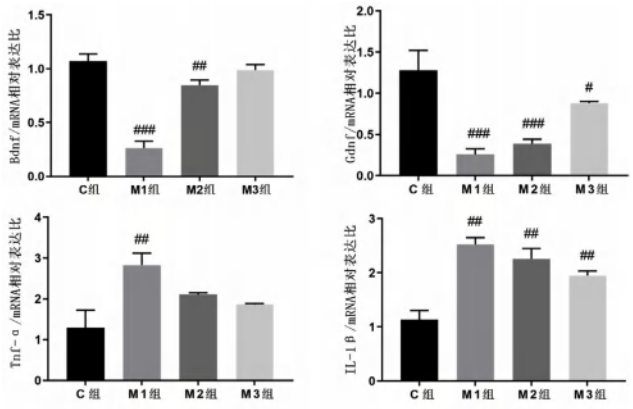


图 6　BCAS 对小鼠脑内神经炎症及神经细胞功能相关基因表达（$n = 3$）

Fig 6　Expression of genes related to nerve inflammation and nerve cell function in BCAS model group（$n = 3$）

注：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

本研究表明，慢性脑低灌注对小鼠体重及心、脾、胰、肝、肾、大脑的脏器比无明显影响，旷场实验证明 BCAS 手术不会损伤小鼠运动行为能力，保证后续行为学的可行性。新物体识别实验和水迷宫实验中 M1 组和 M2 组小鼠表现出明显的学习认知功能障碍。组织学结果同样证明，脑白质损伤严重程度与脑灌注不足的程度密切相关。M2 组模型造成了脑白质髓鞘的损伤。虽然 M1 组小鼠 LFB 染色中髓鞘损伤及染色较 M2 组明显，但由于 M1 组造模过重导致小鼠后期易死亡，在行为学实验中出现不愿探索空间及拒绝重复记忆（漂浮静止、原地转圈）的行为，因此 M1 模型不利于后续实验的开展。

实验性慢性脑低灌注不足引起的病变与皮质下血管性痴呆损伤具有一些共同特征，包括血脑屏障破坏、基质金属蛋白酶和胶质细胞的激活、少突胶质细胞凋亡等。神经炎性反应是一种由中枢神经系统胶质细胞所介导的免疫级联反应[13]。本研究表明，Iba-1 阳性小胶质细胞随脑灌注不足程度加重而增多，且胶质活化会在基因层面上引起显著的神经炎症因子 *Il-1β*、*Tnf-α* 表达增加、神经营养因子 *Bdnf*、*Gdnf* 表达下降，结果与行为学及组织切片结果一致。本实验结果显示，M1 组模型程度最重，M3 组模型造模较轻，与正常组的差异无统计学意义，而 M2 组模型（4.5 mm 长度的微线圈）可以较好地模拟显著的血管性认知行为受损和病理损伤。M2 组模型呈现破坏的轴突胶质连接完整性，导致白质弥漫性脱髓鞘改变并出现小胶质细胞增生等改变，造成神经元间信号传递受损，导致显著的血管性认知行为受损和病理损伤，并且不出现死亡、痴呆等情况。该模型适用于预防和治疗 VCI 的发病机制研究和设计改善病情的治疗药物研究[14-17]。但本研究仍存在一定的局限性，慢性脑低灌注引起小胶质细胞活化的分子机制，仍需进一步探究。

参考文献

[1] Rundek T，Tolea M，Ariko T，et al. Vascular cognitive impairment（VCI）[J]. Neurotherapeutics，2022，19（1）：68-88.

[2] 沈昆双，孔玲，闫广利，等 . 五味子防治阿尔茨海默病的作用机制研究进展 [J]. 中南药学，2023，21（2）：462-470.

[3] Razek A，Elsebaie NA. Imaging of vascular cognitive impairment [J]. Clin Imaging，2021，74：45-54.

[4] Shibata M，Ohtani R，Ihara M，et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Stroke，2004，35（11）：2598-2603.

[5] 后显华 . CD73 在慢性低灌注脑白质损伤中的作用及其炎性调控机制研究 [D]. 重庆：第三军医大学，2015.

[6] 侯外方，张茂森，张琳，等 . 血管性认知障碍动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报，2021，29（4）：542-552.

[7] Nishio K，Ihara M，Yamasaki N，et al. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy [J]. Stroke，2010，41（6）：1278-1284.

[8] Yang Y，Kimura-Ohba S，Thompson J，et al. Rodent models of vascular cognitive impairment [J]. Transl Stroke Res，2016，7（5）：407-414.

[9] Biose IJ，Bix GJ. Bilateral carotid artery stenosis and cerebral blood flow outcomes [J]. Methods Mol Biol，2023，2616：39-46.

[10] 陈景，杨磊，左亚杰，等 . 黄芩苷改善慢性脑低灌注大鼠认知障碍的作用及机制研究 [J]. 中南药学，2021，19（7）：1333-1338.

[11] Liu CY，Tian Q，Wang JF，et al. Blocking P2RX7 attenuates ferroptosis in endothelium and reduces HG-induced hemorrhagic transformation after MCAO by inhibiting ERK1/2 and P53 signaling pathways [J]. Mol Neurobiol，2023，60（2）：460-479.

[12] 郭文娟，张綦慧 . 啮齿类慢性脑低灌注动物模型的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2022，20（6）：1032-1035.

[13] 骆珺婕，蓝浩文，蒋继军，等 . *L*- 苏糖酸镁对慢性脑低灌注脑白质损伤的影响 [J]. 华夏医学，2022，35（5）：8-12.

[14] 杜宇，宋玉菲，张晓洁，等 . 糖尿病合并慢性脑低灌注小鼠认知功能改变及星形胶质细胞变化的研究 [J]. 中国临床神经科学，2018，26（2）：177-183.

[15] Kim SY，Kim YJ，Cho SY，et al. Efficacy of Artemisia annua Linné in improving cognitive impairment in a chronic cerebral hypoperfusion-induced vascular dementia animal model [J]. Phytomedicine，2023，112：154683.

[16] 李汶泽，李智，万梅绪，等 . 注射用丹参多酚酸对脑缺血再灌注后脑功能保护作用的研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（11）：2658-2664.

[17] 张琳洁，于永生 . cGAS-STING 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（9）：1982-1990.

（收稿日期：2023-02-20；修回日期：2023-05-12）

基于非靶向代谢组学的儿童川崎病血浆生物标志物筛选研究

张俊[1]，葛亚文[1]，周霄颖[1]，封其华[3]，崔玥[1]，张芝艳[1]，王秋伟[1]，张雯婷[1, 2*]（1. 南通大学附属常州儿童医院，江苏 常州 213003；2. 常州市气管炎研究所，江苏 常州 213003；3. 苏州大学附属儿童医院，江苏 苏州 215003）

摘要：目的 通过非靶向代谢组学方法探究川崎病（KD）儿童血浆中代谢物的变化。**方法** 采用病例对照研究，选用 2021 年 5 月到 2022 年 5 月在南通大学附属常州儿童医院风湿免疫科确诊为 KD 的 22 例患儿为病例组，并以同期 21 例健康体检儿童作为对照组，采集入组儿童的血浆样本进行基于 HPLC-MS/MS 系统四极杆 - 静电场轨道阱 Orbitrap 质谱仪的代谢组学检测，并以正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）进行建模，以模型的 VIP 值＞ 1 和 *t*-test 比较中 $P < 0.05$ 作为标准筛选 KD 儿童血浆样本中的特异性差异代谢物；并选用 KEGG 数据库对差异代谢物进行注解，用 MetaboAnalyst 软件对其进行富集分析和拓扑分析，以筛选 KD 儿童血浆中涉及的关键差异代谢通路。**结果** 代谢组学分析结果表明：① OPLS-DA 模型中，KD 组和正常组儿童血浆代谢轮廓存在显著差异，组间存在 393 种差异表达的代谢物，上调的代谢物包括 1-甲基腺苷（＋ 85%）、二脂酰甘油基三甲基高丝氨酸（3：0/20：4）(＋ 2234%）、嘌呤（＋ 220%）等，下调的代谢物包括溶血磷脂酰胆碱（P-16：0）(－ 71%）、异羟脱氧胆酸（－ 79%）等；② MetaboAnalyst 结果显示，鞘脂代谢、咖啡因代谢和酪氨酸代谢通路是 KD 病理状态中改变最显著的差异代谢通路。**结论** KD 病理状态可造成血浆代谢物谱的显著变化；鞘脂代谢、咖啡因代谢和酪氨酸代谢是改变最显著的差异代谢通路，提示 KD 会系统性地扰动患儿的生理代谢活动，本文从代谢组学角度较系统地揭示了 KD 儿童和健康儿童的差异代谢物和代谢通路，为 KD 的早期诊疗和对应的药物开发提供参考。

关键词：川崎病；代谢组学；生物标志物；代谢通路

中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1726-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.006

Plasma biomarker screening in pediatric Kawasaki disease based on non-target metabolomics

ZHANG Jun[1], GE Ya-wen[1], ZHOU Xiao-ying[1], FENG Qi-hua[3], CUI Yue[1], ZHANG Zhi-yan[1], WANG Qiu-wei[1], ZHANG Wen-ting[1, 2*] (1. *Affiliated Changzhou Children's Hospital of Nantong University*, *Changzhou Jiangsu* 213003; 2. *Research Center for Asthma and Bronchitis of Changzhou*, *Changzhou Jiangsu* 213003; 3. *Children's Hospital Affiliated to Soochow University*, *Suzhou Jiangsu* 215003)

Abstract: Objective To explore the metabolic changes in the plasma of children with Kawasaki disease (KD) with non-targeted metabonomics. **Methods** The case control study was conducted. Totally 22 children with KD diagnosed in our hospital from May 2021 to May 2022 were enrolled, and 21 healthy children served as the control group. Plasma samples of the children were collected for metabonomics detection based on HPLC-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry. Orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA) model was used to discriminate the groups. The VIP value of the model ＞ 1 and $P < 0.05$ in *t*-test comparison were used as criteria to

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81801493）；中国博士后科学基金第 70 批面上资助项目（No.2021M700546）；常州市科技计划项目（No.CJ20210149；No.CJ20210161）；常州市卫生健康青苗人才工程（No.CZQM2020105）。

作者简介：张俊，女，副主任医师，主要从事风湿免疫类疾病的临床诊疗和研究，email：1936607973@qq.com ***通信作者：**张雯婷，女，博士，副主任药师，副研究员，硕士研究生导师，主要从事儿科重大疾病的生物标志物和药学防御策略研究，email：saiyuketia@163.com

screen the specific differential metabolites in plasma samples of KD children; KEGG database was used to annotate the differential metabolites, and MetaboAnalyst software was used to conduct the enrichment and topologic analysis and to screen the key differential metabolic pathways involved in the plasma of KD children. **Results** The metabonomics showed that: ① OPLS-DA model showed significant differences in the plasma metabolic profiles between the KD group and the control group. There were 393 differentially expressed metabolites between groups. The up-regulated metabolites included 1-methyladenosine (＋ 85%), DGTs (3∶0/20∶4) (＋ 2234%), and purine (＋ 220%); and the down-regulated metabolites included lysophosphatidylcholine (P-16∶0) (－ 71%) and isohydroxydeoxycholic acid (－ 79%); ② MetaboAnalyst showed that sphingolipid metabolism, caffeine metabolism and tyrosine metabolism were the most significant differential metabolic pathways in the pathological condition of KD. **Conclusion** KD can cause significant changes in the plasma metabolome profile. The most significant differential metabolic pathways include sphingolipid metabolism, caffeine metabolism and tyrosine metabolism, suggesting that KD systematically disturbs the physiological metabolic processes in children. This study reveals the differential metabolites and metabolic pathways between the KD and healthy children by metabolomics, and provides reference for the early diagnosis, treatment and research of novel drugs for KD.

Key words: Kawasaki disease; metabolomics; biomarker; metabolic pathway

川崎病（Kawasaki disease，KD）又称黏膜皮肤淋巴结综合征，是一种全身性炎症疾病，主要发生在 5 岁以下的儿童，其典型病理特征为全身性血管炎 [1]。近年来，KD 发病率逐年增加，我国研究显示，近 20 年 KD 发病率增加约 10 倍，由 1998 年的 16.8/10 万增加到 2017 年的 104.6/10 万 [2]，并逐渐成为儿童获得性心脏病的主要原因。在临床诊疗中，早期及时准确诊断和评估 KD 对于避免心肌梗死、冠状动脉狭窄、缺血性心肌病、大型冠状动脉动脉瘤的形成及破裂等 KD 相关冠状动脉病变（coronary artery lesions，CALs）的发生和发展具有重要意义 [3]。

由于患儿早期 KD 临床症状不典型，相关的血生化指标如血小板、血沉、C 反应蛋白、血清转氨酶、N 端脑钠肽前体和 γ- 谷氨酰转肽酶等缺乏疾病特异性，目前 KD 的早期明确诊断仍存在困难 [4-5]。筛选 KD 中的特异性生物标志物对于其早期诊疗、规避严重并发症的产生、提升 KD 患儿生命质量具有重要的医学价值。代谢组学是继基因组学、转录组学、蛋白质组学后，系统生物学的又一重要研究领域，基于质谱的代谢组学方法可以同时检测和量化数千甚至数万代谢物特征，可用于代谢性异常相关疾病发病机制的研究 [6-7]。目前，代谢组学技术在多种癌症以及糖尿病、冠心病等慢性疾病的研究中被用于疾病生物标志物的筛查、药学防治靶标探索、治疗相应标志物筛查等方面 [8-11]，但代谢组学在 KD 中的应用却鲜有报道。KD 是一种全身性的血管炎 [1]，深入解析血液中代谢谱的变化对该疾病的病理进程理解具有重要意义。

因此本研究选择 KD 患儿与健康儿童血浆作为样本进行代谢组学研究，为进一步探索 KD 的发病机制、早期诊断以及发掘对应的药学干预靶标提供切实证据和线索。

1　方法

1.1　研究对象

本研究采用病例对照研究，收集 2021 年 5 月至 2022 年 5 月在本院住院临床诊断完全性 KD 且未开始治疗的 22 例患儿的血浆标本作为病例组，同时收集同期门诊健康体检儿童 21 例的血浆标本作为对照组。KD 组平均年龄为（2.28±0.35）岁，男女比例为 14∶8 对照组平均年龄为（1.88±0.27）岁；男女比例为 16∶5，两组年龄和性别差异无统计学意义。本研究通过南通大学附属常州儿童医院医学伦理委员会审核批准 [常儿伦字（2021）006 号文件]，在获取患儿家属知情同意之后采集其样本和临床信息。

入选标准及排除标准。完全性 KD 患儿纳入标准：① 年龄 6 个月～ 10 岁；② 首次确诊 KD；③ 符合 2017 年美国儿科学会和心脏病学会制订的 KD 诊断标准 [12]；④ 尚未接受药物治疗。排除标准：①合并 EB 病毒感染、腺病毒感染等发热性疾病者；② 入院时已度过急性期者；③ 患有先天性心脏病者；④ 已使用免疫球蛋白及阿司匹林治疗者。

1.2 试药与仪器

LC-MS 级甲醇、乙腈（CNW Technologies 公司），LC-MS 级乙酸铵（Sigma-Aldrich 公司），LC-MS 级氨水（Fisher Chemical 公司），超纯水（ddH_2O）（屈臣氏）。Vanquish 超高效液相色谱、Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱、Heraeus Fresco17 离心机（Thermo Fisher Scientific），BSA124S-CW 天平（Sartorius），PS-60AL 超声仪（深圳市雷德邦电子有限公司）。

1.3 代谢组学检测

1.3.1 血浆标本前处理 ① 血样收集在离心管中，室温静置 1 h 进行凝固分层，3000 r • min^{-1} 室温离心 10 min，取上清液，再 12 000 r • min^{-1}、4 ℃离心 10 min，取上清液分装到 1.5 mL 离心管中，每管 0.2 mL，－ 80 ℃冻存。② 取－ 80 ℃低温保存的血浆样品融化后，移取 100 μL 样品至 EP 管中，加入 300 μL 提取液（甲醇，含同位素标记内标混合物），涡旋混匀 30 s，超声 10 min（冰水浴），－ 40 ℃静置 1 h；再将样品 12 000 r • min^{-1}、4 ℃（离心力 13 800 g，半径 8.6 cm）离心 15 min；取上清液于进样瓶中上机检测；所有样品另取等量上清液混合成 QC 样品上机检测。

1.3.2 色谱和质谱参数 待测样本使用 Vanquish 超高效液相色谱仪和 Waters ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱对目标化合物进行色谱分离，流动相 A 为水相（含 5 mmol • L^{-1} 乙酸铵和 5 mmol • L^{-1} 乙酸），流动相 B 为乙腈（采用梯度洗脱：0 ～ 0.7 min，1%B，流速 0.35 mL • min^{-1}；0.7 ～ 9.5 min，1% ～ 99%B，流速 0.35 mL • min^{-1}；9.5 ～ 11.8 min，99%B，流速 0.35 ～ 0.5 mL•min^{-1}；11.8 ～ 12 min，99% ～ 1%B 相，流 速 0.5 mL • min^{-1}；12 ～ 14.6 min，1%B， 流速 0.5 mL • min^{-1}；14.6 ～ 14.8 min，1%B， 流速 0.5 ～ 0.35 mL•min^{-1}；14.8 ～ 15 min，1%B，流速 0.35 mL • min^{-1}），进样体积：2 μL。Orbitrap Exploris 120 质谱仪在控制软件（Xcalibur4.4，Thermo）控制下进行一级、二级质谱数据采集。质谱参数：壳气流速 50 Arb，辅助气流速 15 Arb，毛细管温度 320 ℃，一级质谱分辨率为 60 000，二级质谱分辨率为 15 000，碰撞能量：NCE 模式下 10/30/60，喷雾电压：3.8 kV（正离子）或 3.4 kV（负离子）。质谱原始数据经 ProteoWizard 软件转成 mzXML 格式后，使用自主编写的 R 程序包（内核为 XCMS）进行峰识别、提取、对齐以及积分等处理后，与 BiotreeDB 自建二级质谱数据库进行匹配和物质注释，算法打分的 Cutoff 值设为 0.3。

1.4 统计学方法

符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组均数比较采用 t 检验。计数资料用百分率表示，采用 χ^2 检验。应用多元变量统计分析软件 SIMCAl6.0.2（Umea，瑞典）对所有样本的代谢物检测数据进行分析，建立正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）模型，以 OPLS-DA 模型中的得分散点图可视化组间差异，OPLS-DA 中变量投影重要度（VIP）值反映变量对于组间差异的贡献率。以 t 检验中 $P < 0.05$ 和 OPLS-DA 中 VIP ＞ 1 作为差异代谢物筛选的条件。应用 MetaboAnalyst 4.0 在线分析软件对差异代谢物进行通路富集分析和通路拓扑分析，以富集分析的 $P < 0.05$ 和通路拓扑分析的 Impact ＞ 0.05 作为显著差异代谢通路的筛选条件，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆样品代谢轮廓分析

为了探讨 KD 患儿与健康儿童相比血浆样本中出现的代谢差异，探索与该疾病病理进程相关的生物标志物，本研究对 KD 患儿和对照组儿童的血浆代谢物进行了主成分分析（PCA）和 OPLS-DA 分析。PCA 结果表明，第一主成分（PC1）的贡献率是 34%，第二主成分（PC2）的贡献率是 8.4%，两者总贡献率是 42.4%。两组能够明显分开，并且呈现出较明显的聚类体征，从整体上能够反映出两组样本之间的代谢差异（见图 1A）。OPLS-DA 作为一种监督分类模型，可获取更加可靠的代谢物的组间差异与 KD 组的相关程度信息（见图 1B），OPLS-DA 结果表明该模型能够对两组样本进行有效区分，OPLS-DA 模型的置换检验的 $R^2Y_{cum} = 0.41$，$Q^2_{cum} = -1.28$，说明原模型具有良好的稳健性，不存在过拟合现象，充分说明其可用于探索两组样本的代谢物差异（见图 2）。

2.2 KD 中潜在生物标志物的筛选

为筛选 KD 中的特异性代谢物，以 t 检验的 P 值小于 0.05 和 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP 大于 1 为差异代谢物筛选标准。两组样本中共得到 393 个差异代谢物，上调的差异代谢物有 267 个，下调的差异代谢物的有 126 个（见图 3），其中 VIP 值排名前 30 位的差异代谢物见表 1，KD 中最特征性的代谢物为 1- 甲基腺苷（＋ 85%，$P < 0.05$）、二脂酰甘油基三甲基高丝氨酸（3：0/20：4）（＋ 2234%，$P < 0.05$）、嘌呤

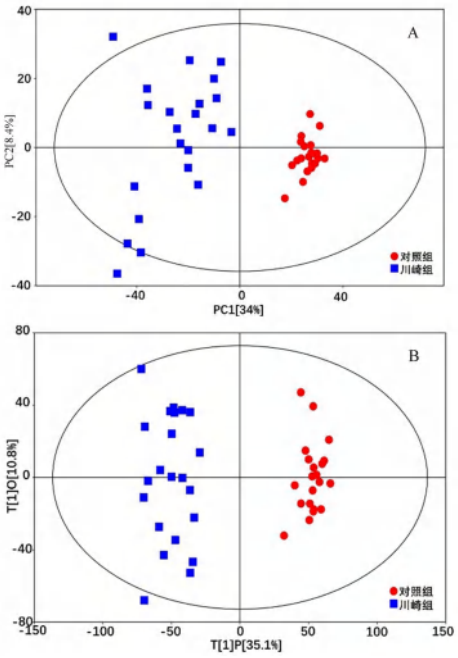


图 1　KD 组与对照组儿童血浆代谢物的 PCA（A）和 OPLS-DA 图（B）

Fig 1　Score scatter plot of PCA model（A）and OPLS-DA model（B）between the KD group and the control group

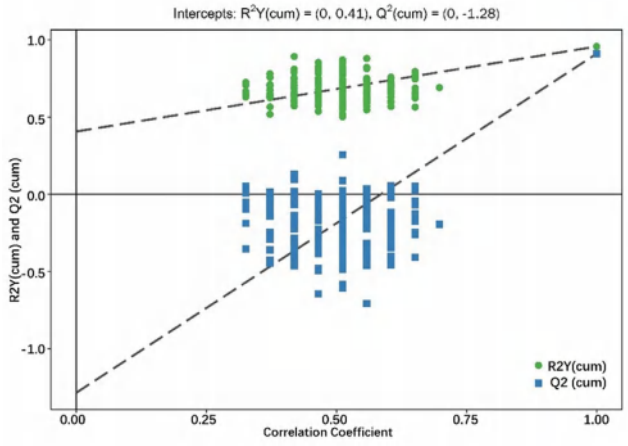


图 2　OPLS-DA 模型的置换检验结果点状图

Fig 2　Permutation plot test of OPLS-DA model between the KD group and the control group

（＋ 220%，$P < 0.05$）、*L*- 尿胆素原（＋ 1400%，$P < 0.05$）、*L*- 半乳糖（＋ 411%，$P < 0.05$）、溶血磷脂酰胆碱（P-16：0）（－ 71%，$P < 0.05$）等。

2.3　KD 差异代谢通路分析

将 KD 组和对照组的差异代谢物应用 MetaboAnalyst 4.0 在线分析软件进行通路富集分析和通路拓扑分析，以富集分析的 $P < 0.05$ 和拓扑分析的影响因子 Impact ＞ 0.05 作为显著差异代谢通路的筛选条件。结果表明，通过通路的富集分析和拓扑分析发现鞘脂代谢、咖啡因代谢、酪氨酸代谢为 KD 条件下的差异代谢通路（见图 4）。在鞘

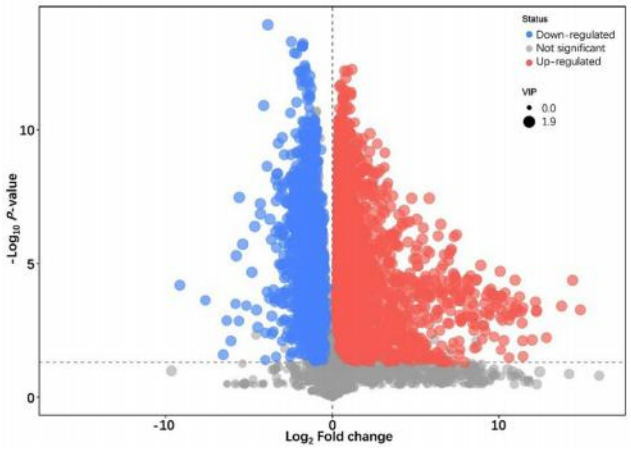


图 3　KD 组与对照组的差异代谢物火山图

Fig 3　Volcano plot of differential metabolites between the KD group and the control group

注：上调的代谢物以红色表示，显著下调的用蓝色表示，非显著差异的代谢物为灰色。

Note：Red circles represent metabolites up-regulated in KD；blue circles represent metabolites down-regulated in KD；gray circles represent non-differential metabolites.

脂代谢通路中，鞘氨醇、二氢神经酰胺、植物鞘氨醇、3- 脱氢二氢鞘氨醇均显著升高；咖啡因代谢通路中，茶碱、黄嘌呤显著升高，可可碱明显降低；酪氨酸代谢通路中，去甲肾上腺素、琥珀酸半醛、丙酮酸、苯酚均显著升高，3，4- 二羟基苯乙酸、迷迭香酸明显降低（见表 2）。

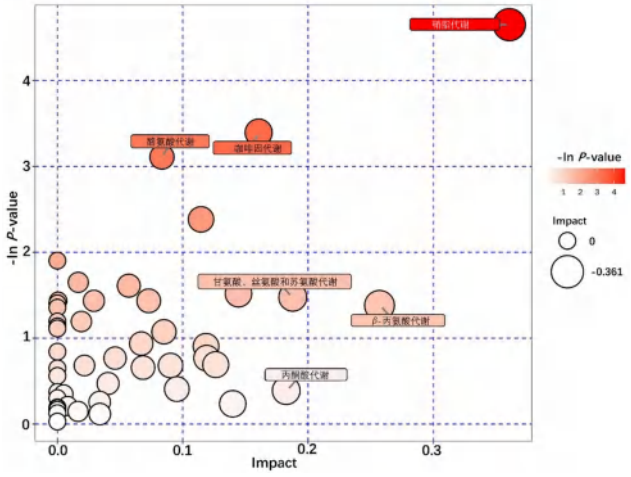


图 4　KD 中的特征性差异代谢物所映射到的代谢通路

Fig 4　Metabolic pathway of differential metabolites between the KD group and the control group

3　结论

KD 作为儿童常见的急性血管炎症性疾病，病因及发病机制涉及多条生理病理通路的异常变化，具体机制尚不明确，其早期诊断依旧是困扰临床的重要问题[13-14]，基于生物标志物的 KD 诊断研究具有重要临床价值。本研究借助 LC-MS/MS 系统四

表 1 KD 相关差异代谢物 (VIP 值前 30 位)

Tab 1 Differential metabolites of the KD group and the control group (top 30 VIP values)

名称	MS^2 score	保留时间 /min	质荷比	VIP	*P* 值	变化倍数
1- 甲基腺苷	0.85	100.42	282.12	1.76	＜ 0.001	1.85
二脂酰甘油基三甲基高丝氨酸（3：0/20：4）	0.50	380.71	578.40	1.74	0.005	23.34
嘌呤	0.53	42.70	119.04	1.73	＜ 0.001	3.20
二脂酰甘油基三甲基高丝氨酸（2：0/22：3）	0.64	340.34	691.34	1.73	＜ 0.001	10.08
L- 尿胆素原	0.40	347.95	597.36	1.73	＜ 0.001	15.00
L- 半乳糖	0.37	42.26	198.10	1.72	＜ 0.001	5.11
溶血磷脂酰胆碱（P-16：0）	0.76	554.33	480.34	1.71	＜ 0.001	0.29
异羟脱氧胆酸	1.00	463.86	391.29	1.71	＜ 0.001	0.21
丁二酸半醛	0.98	42.60	101.02	1.71	＜ 0.001	3.26
5- 乙酰基 -2，4- 二甲基噁唑	0.96	42.31	140.07	1.70	＜ 0.001	2.59
磷脂酰胆碱（22：6e/2：0）	0.65	572.31	596.38	1.69	＜ 0.001	0.13
β-D- 氨基葡萄糖	0.72	42.34	180.09	1.68	＜ 0.001	5.28
溶血磷脂酰胆碱 [18：4（6*Z*，9*Z*，12*Z*，15*Z*）]	0.57	496.28	516.31	1.68	＜ 0.001	0.41
戊二酸	0.80	41.95	131.04	1.68	＜ 0.001	3.85
鞘氨醇	0.82	538.33	302.31	1.68	＜ 0.001	1.76
7*Z*- 十四烯酸	0.62	485.69	227.20	1.68	＜ 0.001	1.32
哌啶酸	0.99	549.44	130.09	1.68	＜ 0.001	1.49
D- 木糖	0.65	42.00	149.05	1.67	＜ 0.001	3.40
吡咯烷酮羧酸	1.00	45.34	128.04	1.67	＜ 0.001	0.41
二脂酰甘油基三甲基高丝氨酸（2：0/3：0）	0.50	199.57	334.19	1.67	＜ 0.001	12.67
N_6- 乙酰基 -5*S*- 羟基 -*L*- 赖氨酸	0.76	342.41	205.12	1.67	＜ 0.001	22 019.18
2- 丁烯酸	0.41	41.98	85.03	1.66	＜ 0.001	3.86
溶血磷脂酰胆碱（16：1）	0.88	496.64	538.32	1.65	＜ 0.001	0.39
磷脂酰胆碱（14：1e/2：0）	0.94	511.25	494.32	1.65	＜ 0.001	0.29
牛去氧胆酸	0.77	382.66	500.30	1.65	0.006	24.35
葡萄糖醛酸二酰甘油（12：0/17：1）	0.57	766.39	699.48	1.65	＜ 0.001	1.68
脱氢藻磷苷	0.70	524.96	316.28	1.65	＜ 0.001	1.44
4- 羟基 -2- 丁烯酸 γ- 内酯	0.64	42.54	85.03	1.64	＜ 0.001	2.99
吲哚 -3- 羧酸	0.89	341.13	254.14	1.64	＜ 0.001	2104.54
3- 吲哚丁酸	0.71	303.46	204.11	1.64	＜ 0.001	0.23

表 2 KD 病理进程中的关键差异代谢通路

Tab 2 Key differential metabolic pathways in the pathological process of KD

代谢通路	KEGG 数据库代谢通路中所有代谢物的个数	差异代谢物命中该通路的个数	富集分析 *P* 值	− ln（*P*）	拓扑分析 Impact 值	涉及该条通路的差异代谢物的名称及其 KEGG ID
鞘脂代谢	25	4	0.010	4.650	0.36	鞘氨醇（cpd：C00836）；二氢神经酰胺（cpd：C12126）；植物鞘氨醇（cpd：C12144）；3- 脱氢二氢鞘氨醇（cpd：C02934）
咖啡因代谢	21	3	0.034	3.394	0.16	黄嘌呤（cpd：C00385）；茶碱（cpd：C07130）；可可碱（cpd：C07480）
酪氨酸	76	6	0.045	3.108	0.08	去甲肾上腺素（cpd：C05589）；3，4- 二羟基苯乙酸（cpd：C01161）；琥珀酸半醛（cpd：C00232）；丙酮酸（cpd：C00022）；苯酚（cpd：C00146）；迷迭香酸（cpd：C01850）

极杆 - 静电场轨道阱 Orbitrap 质谱仪的非靶向代谢组学检测方法，分析了 KD 和健康儿童两者血浆代谢物的差异，发现 KD 病理状态可造成血浆代谢物谱显著偏离正常态；其中鞘脂代谢、咖啡因代谢和酪氨酸代谢是改变最显著的差异代谢通路，提示 KD 会系统性地扰动患儿的生理代谢活动。

在本研究中，与正常组相比，KD 患者血浆代谢组中有 393 种代谢物出现显著变化，以磷脂

类脂质、有机酸和有机碱为主，特征性变化为磷脂中多种磷脂酰胆碱（phosphatidylcholine，PC）、溶血磷脂酰胆碱（lyso-phosphatidylcholine，LPC）浓度均出现显著下降。PC 是均匀分布于细胞膜的磷脂类成分，也是过氧化物酶体增殖物激活受体的配体；LPC 是氧化型低密度脂蛋白的关键活性成分，对血管内皮细胞有直接的损伤作用，还可通过影响氧化应激压力、血管内皮功能和炎症响应影响血管稳态 [15-17]。此外，LPC 可上调人血管内皮细胞中多种黏附分子、细胞因子和趋化因子的表达，还能通过调节 CD36、MHC Ⅱ 分子从而将造血干细胞转化为天然免疫细胞 [18]，表明 LPC 不仅对血管内皮细胞的活化具有诱导作用，还具备直接的免疫调节作用，其在 KD 中的下降可能与 KD 病理机制中所涉及的血管和免疫稳态失衡有关。与 KD 共享多条病理通路的血管炎——IgA 血管炎的最新代谢研究已经证实：脂质代谢物是 IgA 血管炎和 IgA 肾炎的重要代谢标志物群体，IgA 血管炎和相关肾脏并发症的疾病进展与磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine，PE）向 PC 的转化过程出现异常有关 [19]。

本研究的代谢通路分析结果表明鞘脂代谢通路是 KD 中最显著的差异代谢通路（$P = 0.01$），该通路中鞘氨醇、二氢神经酰胺、3- 脱氢二氢鞘氨醇等代谢物含量在 KD 患者血浆中显著上调。鞘脂类作为真核生物细胞膜的重要组成部分，在调节细胞的生长、分化、衰老和细胞凋亡中起着重要的信号转导作用 [20]。鞘脂代谢的改变已经在动脉粥样硬化、缺血性损伤等多种血管疾病中被发现，鞘脂类家族成员神经酰胺和鞘氨醇可作用于脂蛋白相关的鞘磷脂，将其转化为神经酰胺，从而促进缺血 / 再灌注损伤 [21]。此外，炎症诱导物细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）和棕榈酸对微血管内皮的关键损伤机制之一即是通过刺激神经酰胺的从头合成、增加鞘磷脂的水解而进行，在添加神经酰胺合成抑制剂和鞘磷脂水解阻断剂后，LPS 和棕榈酸诱导的炎症因子释放显著减少 [22]，表明鞘脂代谢可能在机体炎症响应调控和免疫自稳过程中发挥关键作用。鞘脂类成分在血管炎症反应和血管损伤中的既往研究与本研究的结论一致，表明鞘脂类成分是 KD 中的重要生物标志物；而鞘脂代谢是 KD 防治策略开发的潜在靶标。

本研究中，咖啡因代谢通路中黄嘌呤及其衍生物茶碱和可可碱含量在 KD 组中受到显著干扰。一方面黄嘌呤及其衍生物作为环核苷酸磷酸二酯酶抑制具有高效的抗炎、抗氧化以及抗菌等生物学活性 [23]；另一方面，黄嘌呤及其衍生物在代谢为尿酸的过程中可产生大量的活性氧簇 [24]，从而造成血管内皮的氧化应激损伤，因此 KD 的病理进程可能与黄嘌呤及其衍生物代谢异常相关，而具体的作用机制有待进一步探索。

此外，本研究还发现酪氨酸代谢通路是 KD 中的关键变化通路，该通路中的去甲肾上腺素、琥珀酸半醛等代谢物均显著升高。去甲肾上腺素以及抑制性神经递质 γ- 氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）的主要代谢产物琥珀酸半醛在 KD 中的变化表明血管神经调节异常可能参与 KD 的发生发展。此外，近年来的研究揭示去甲肾上腺素对于血管内皮功能具有复杂的双向调节作用：其可通过调节 NADPH 氧化酶介导 caspase3 激活从而诱导肺血管内皮细胞的死亡 [25]；但其在细菌 LPS 诱导的脐静脉内皮细胞中具有抑制炎症的作用 [26]，在 KD 伴随的微血管损伤中的作用有待进一步探索。值得注意的是，本研究中纳入的均为完全性 KD，不完全性 KD 的代谢特征需要进一步研究。

综上所述，本研究采用 HPLC-MS/MS 非靶标代谢组学技术，探讨了 KD 患者血浆中小分子代谢物的变化特点，并发现 1- 甲基腺苷、多种 PC 和 LPC 等代谢物是 KD 中出现变化的特征性差异代谢物和潜在的生物标志物，同时发现鞘脂代谢、咖啡因代谢、酪氨酸代谢等通路是 KD 中的差异代谢通路和潜在干预靶标通路。本研究从代谢组的角度为 KD 的发病机制研究提供新方向，同时也可为 KD 的早期诊断和药学干预提供新线索。

参考文献

[1] Rife E，Gedalia A. Kawasaki disease：an update [J]. Curr Rheumatol Rep，2020，22（10）：75.

[2] Xie LP，Yan WL，Huang M，et al. Epidemiologic features of Kawasaki disease in Shanghai from 2013 through 2017 [J]. J Epidemiol，2020，30（10）：429-435.

[3] Duan JY，Jiang HH，Lu M. Risk factors for coronary artery lesions in children with Kawasaki disease [J]. Arch Argent Pediatr，2020，118（5）：327-331.

[4] Kainth R，Shah P. Kawasaki disease：origins and evolution [J]. Arch Dis Child，2021，106（4）：413-414.

[5] Van SD，Planken RN，Groenink M，et al. Coronary artery assessment in Kawasaki disease with dual-source CT angiography to uncover vascular pathology [J]. Eur Radiol，

2020，30（1）：432-441.
[6] Alseekh S，Aharoni A，Brotman Y，et al. Mass spectrometry-based metabolomics：a guide for annotation，quantification and best reporting practices [J]. Nat Methods，2021，18（7）：747-756.
[7] Gika HG，Theodoridis GA，Wilson ID. Metabolic profiling：status，challenges，and perspective [J]. Methods Mol Biol，2018，1738：3-13.
[8] Griffin JL. Twenty years of metabonomics：so what has metabonomics done for toxicology? [J]. Xenobiotica，2020，50（1）：110-114.
[9] Everett JR. Pharmacometabonomics：the prediction of drug effects using metabolic profiling [J]. Handb Exp Pharmacol，2019，260：263-299.
[10] Wang Z，Zhu C，Nambi VJ，et al. Metabolomic pattern predicts incident coronary heart disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2019，39（7）：1475-1482.
[11] Ma QT，Li YQ，Wang M，et al. Progress in metabonomics of type 2 diabetes mellitus [J]. Molecules，2018，23（7）.
[12] Mccrindle BW，Rowley AH，Newburger JW，et al. Diagnosis，treatment，and long-term management of Kawasaki disease：a scientific statement for health professionals from the American Heart Association [J]. Circulation，2017，135（17）：e927-e999.
[13] Han SB，Lee SY. Macrophage activation syndrome in children with Kawasaki disease：diagnostic and therapeutic approaches [J]. World J Pediatr，2020，16（6）：566-574.
[14] Maddox RA，Person MK，Kennedy JL，et al. Kawasaki disease and Kawasaki disease shock syndrome hospitalization rates in the United States，2006 — 2018 [J]. Pediatr Infect Dis J，2021，40（4）：284-288.
[15] Law SH，Chan ML，Marathe GK，et al. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases [J]. Int J Mol Sci，2019，20（5）：1149.
[16] Paapstel K，Kals J，Eha J，et al. Inverse relations of serum phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholines with vascular damage and heart rate in patients with atherosclerosis [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis，2018，28（1）：44-52.
[17] Bao L，Qi J，Wang YW，et al. The atherogenic actions of LPC on vascular smooth muscle cells and its LPA receptor mediated mechanism [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，503（3）：1911-1918.
[18] Li X，Wang L，Fang P，et al. Lysophospholipids induce innate immune transdifferentiation of endothelial cells，resulting in prolonged endothelial activation [J]. J Biol Chem，2018，293（28）：11033-11045.
[19] Liu Y，Wen M，He Q，et al. Lipid metabolism contribute to the pathogenesis of IgA vasculitis [J]. Diagn Pathol，2022，17（1）：1-13.
[20] Hannun YA，Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2018，19（3）：175-191.
[21] Reforgiato MR，Milano G，Fabriàs G，et al. Inhibition of ceramide de novo synthesis as a postischemic strategy to reduce myocardial reperfusion injury [J]. Basic Res Cardiol，2016，111（2）：12.
[22] Lu Z，Li Y，Ru JH，et al. Interaction of palmitate and LPS regulates cytokine expression and apoptosis through sphingolipids in human retinal microvascular endothelial cells [J]. Exp Eye Res，2019，178：61-71.
[23] Singh N，Shreshtha AK，Thakur MS，et al. Xanthine scaffold：scope and potential in drug development [J]. Heliyon，2018，4（10）：e00829.
[24] Albanese CT，Rowe MI. Necrotizing enterocolitis [J]. Semin Pediatr Surg，1995，4（4）：200-206.
[25] Chignalia AZ，Weinberg G，Dull RO. Norepinephrine induces lung microvascular endothelial cell death by NADPH oxidase-dependent activation of caspase-3 [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020：2563764.
[26] 胡静，龙燕琼，岳阳，等 . 去甲肾上腺素减轻脂多糖所致内皮细胞损伤 [J]. 中国病理生理杂志，2018，34（4）：735-738.

（收稿日期：2022-10-08；修回日期：2023-01-20）

生理药动学模型预测国产左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性及对体内药动学影响

石笑弋[1, 2, 3]，刘轶[1, 2, 3*]，兰文[1, 2, 3]，李昌亮[1, 2, 3]，李琦[1, 2, 3]，刘雁鸣[1, 2, 3]，李帅[1, 2, 3]，陈涛[4]
（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点试验室，长沙　410001；3. 湖南省药品质量评价工程技术研究中心，长沙　410001；4. 上海凡默谷信息技术有限公司，上海　200127）

摘要：目的　预测国产左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性及对体内药动学的影响。**方法**　根据不同厂家产品的体外溶出结果拟合体内溶出释放曲线；采用 Gastroplus 软件建立生理药动学模型；虚拟群体模拟预测制剂体外溶出特性以及对体内药动学的影响。**结果**　国产左羟丙哌嗪胶囊在 40 min 内溶出量（Q）达 85% 以上（T85% ＝ 40 min），达峰浓度（C_{max}）、曲线下面积（$AUC_{0\rightarrow\infty}$）等主要药动学参数在偏差范围内；不同厂家胶囊的体外溶出差异未影响体内药动学特征。**结论**　国产左羟丙哌嗪胶囊体外呈快速溶出的特性，有利于其在体内迅速吸收，是发挥药效的有利因素。

关键词：生理药动学模型；左羟丙哌嗪胶囊；体外溶出；药动学
中图分类号：R94，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1733-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.007

Dissolution characteristics of domestic levodropropizine capsules in vitro and their influence on pharmacokinetics in vivo by physiolog based pharmacokinetic model

SHI Xiao-yi[1, 2, 3], LIU Yi[1, 2, 3*], LAN Wen[1, 2, 3], LI Chang-liang[1, 2, 3], LI Qi[1, 2, 3], LIU Yan-ming[1, 2, 3], LI Shuai[1, 2, 3], CHEN Tao[4] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology*, *Changsha* 410001; 3. *Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation*, *Changsha* 410001; 4. *PharmoGo Co.*, *Ltd.*, *Shanghai* 200127)

Abstract: Objective　To predict the dissolution characteristics of domestic levodropropizine capsules in vitro and their effects on pharmacokinetics in vivo. **Methods**　The release rate curve in vivo was fit according to the dissolution of products from different manufacturers in vitro. Physiology based pharmacokinetic model was established by Gastroplus software, the dissolution characteristics of preparations in vitro and the effects on pharmacokinetics in vivo were predicted by virtual population simulation. **Results**　The dissolution rate (Q) of domestic levodropropizine capsules within 40 min was over 85% (T85% ＝ 40 min), with the main pharmacokinetic parameters (C_{max}, $AUC_{0\rightarrow\infty}$ and so on) within the deviation range. The difference in dissolution in vitro did not affect the pharmacokinetic characteristics in vivo. **Conclusion**　Domestic levodropropizine capsules dissolve rapidly in vitro, which is beneficial for its rapid absorption in vivo and the efficacy of drugs.

Key words: physiolog based pharmacokinetic model; levodropropizine capsule; dissolution in vitro; pharmacokinetics

基金项目：2022 年国家药品抽验计划（No. 国药监药管 [2022]1 号）。
作者简介：石笑弋，女，主要从事药物分析与质量标准研究，email：40623099@qq.com　*__通信作者__：刘轶，女，副主任药师，主要从事药物分析与质量标准研究，email：1124655@qq.com

左羟丙哌嗪（levodropropizine）为外周性镇咳祛痰药，通过对气管、支气管 C- 纤维外周选择性抑制作用而发挥镇咳作用，镇咳作用强，维持时间长。由于与β肾上腺素受体、M 胆碱受体和阿片受体均无作用，它的中枢抑制的不良反应较少，是一种高效安全的镇咳药物。临床上主要用于治疗急性上呼吸道感染和急性支气管炎引起的干咳和持续性咳嗽。在肠胃方面的不良反应有恶心、胃灼烧、消化不良、腹泻等[1-4]。1988 年 10 月意大利的 Dompe 和 Mediolanum 公司共同开发了左羟丙哌嗪口服溶液并上市。国内无左羟丙哌嗪进口制剂，我国左羟丙哌嗪目前在售的剂型为胶囊剂[5]。由于原研左羟丙哌嗪片剂无进口，缺少参比制剂，无法采用生物等效性试验评价疗效，而按照新药模式开展大样本临床试验，又受临床资源和资金所限，短时间内难以实现。针对上述问题，本研究借鉴国外新发展的计算机模拟预测技术，以生理药动学模型（physiologically based pharmacokinetic model，PBPK）[6-8] 为主要研究方法，以 2022 年国家药品抽检的左羟丙哌嗪胶囊为对象，通过文献数据搭建 PBPK 模型。通过参考文献以及药动 / 药效（pharmacokinetic/pharmacodynamic，PK/PD）分析预测国产不同左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性以及其差异对体内药动学的影响，为左羟丙哌嗪胶囊的质量与疗效评价提供了一种基于模拟预测的非临床评价方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

Ultimate 3000 高效液相色谱仪（戴安，PDA 紫外检测器）；FADT-801RC 溶出度仪（上海富科思分析仪器有限公司）；XP205 电子分析天平（梅特勒·托利多公司，精度：十万分之一）。左羟丙哌嗪对照品（纯度：99.9%，批号：100678-201502，中国食品药品检定研究院）；左羟丙哌嗪胶囊（规格：60 mg 及 30 mg，3 个厂家共 55 批均为 2022 年国家药品抽检样品）；水为纯化水。

1.2 体外溶出试验

按照《中国药典》2020 年版二部方法[9]，开展常规溶出度检查。根据 FDA 对快速溶出的定义（30 min 内溶出量大于 85%）[10]，对 55 批次样品溶出试验结果拟合溶出释放率曲线，结合 PBPK 模型探讨左羟丙哌嗪胶囊的体外溶出特性。

1.3 PBPK 模型

采用 GastroPlus（version 9.0.0003，Simulations Plus，Inc.USA），利用文献[11-12]搭建 PBPK 模型。采用高级房室吸收与转运模型（advanced compartmental absorption & transit model，ACAT）作为吸收模型，采用 PBPK 模型作为处置模型[13-14]。根据人体的相关生理性质，药物及制剂的理化性质和生理模型的结构，采用机制性卷积分和去卷积分函数模拟预测药物及制剂的体内药代特征。结合体外拟合溶出释放曲线，预测不同释放速率对体内药代特征的影响程度。

1.3.1 模型搭建主要参数 药学性质类参数有：相对分子质量（236.32）、脂水分配系数（0.44）、溶解度（1.0 mg·mL^{-1}，pH 7.2）、等电点（Base，7.35）、人体渗透性（3.08×10^{-4} cm^2·s^{-1}）、扩散系数（0.83×10^{5} cm^2·s^{-1}）、人体口服左羟丙哌嗪胶囊、左羟丙哌嗪含片、左羟丙哌嗪片 60 mg 和 30 mg 后的血药浓度 - 时间曲线，均来源于文献[15-18]。药物粒子密度（1.2 g·mL^{-1}）、剂量体积（250 mL）和沉淀时间（900 s）为软件默认值、药物粒径（25 μm）为软件优化值。人体生理性质参数有：总体清除率 0.362 mL/（min·kg）、分布体积（1.125 L·kg^{-1}）、胆酸盐增溶因子（0）、全血 / 血浆药物浓度比（0.96）、血浆游离药物分数（83.92%）。人体处置参数（CL：23.195 L·h^{-1}，V_2：0.42 L·kg^{-1}，$t_{1/2}$：2.49 h，K_{12}：0.529 h^{-1}，K_{21}：0.805 h^{-1}），为拟合口服左羟丙哌嗪胶囊、左羟丙哌嗪含片、左羟丙哌嗪片 60 mg 和 30 mg 后的血药浓度 - 时间曲线。

1.3.2 模型验证 采用和方差（sum of squares due to error，*SSE*）、均方差（mean squared error，*MES*）、均方根误差（root mean squared error，*RMSE*）、确定系数（R-square，*Rsq*）以及预测误差（prediction error，*PE*）等参数进行模型准确性验证[13]。

1.3.3 模型评估 根据文献[1-4]报道的药动学曲线，在 GastroPlus 的吸收和处置模型中进行相应的临床参数设置，进行 PK 曲线的模拟，并对比预测结果与实测数值间的差异，评估模型预测的准确性。

2 结果

2.1 常规溶出度检查

按照《中国药典》2020 年版二部方法[9]，对 55 批次样品进行溶出度试验，样品在 30 min 内溶出量（*Q*）均在 85% 以上，符合快溶出的特点[11]。

2.2 PBPK 模型预测左羟丙哌嗪胶囊的体内药动学特性

2.2.1 PBPK 模型的搭建与验证 按照“1.3.1”项下参数，采用 GastroPlus 的 PKPlus 模块计算资料

及口服给药后的血药浓度 - 时间曲线数据[19]获得经典房室模型的参数搭建 PBPK 模型，结果表明采用二房室拟合的结果最为准确。由此计算的 V_{ss}/F 为 331.4 L，结合 PBPK 模型推算的 V_{ss}（75 L），反推得到该药物的口服生物利用度约为 23%，可知相应的清除和分布参数。

进一步采用口服数据[12, 15-17]建模，模拟预测达峰浓度（C_{max}）、曲线下面积（$AUC_{0\to\infty}$）按照文献报道的临床给药方式、受试者信息进行剂型、给药剂量和人群参数等模型参数的设置，并开展 PK 曲线的模拟；并对比预测值（C_{max} 167 ng • mL^{-1} 和 AUC 646.2 ng • h • mL^{-1}）与实测数值间的差异，预测偏差都在 ±25% 的范围内，可以认为构建的模型较准确，也证明了预测模型的准确性[20]。从拟合曲线来看，预测曲线与实测数据点重合度良好；表明初步搭建及优化的 PK 模型能够较好地反映左羟丙哌嗪制剂口服给药后在人体内的吸收、分布、代谢、排泄过程（absorption，distribution，metabolism，excretion，ADME）。绘制 PK 曲线模拟与实测结果见图 1。

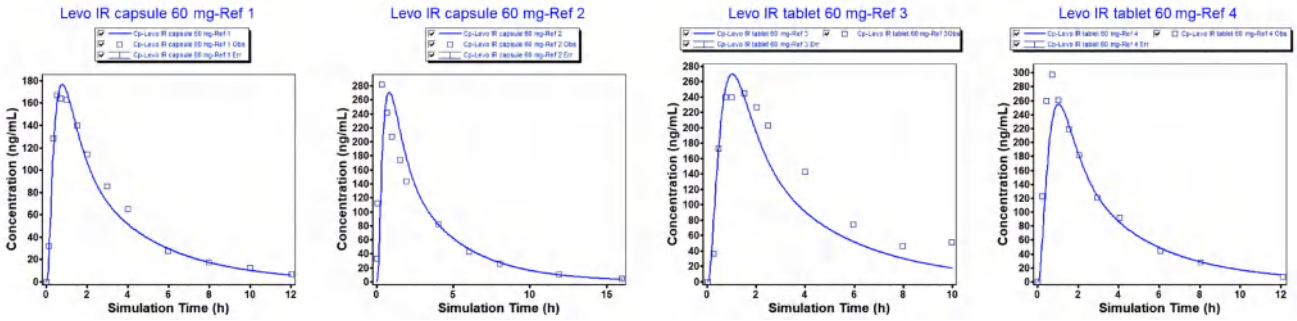


图 1　PK 曲线模拟（曲线）与实测结果（方格）

Fig 1　Simulative PK model（line）and clinical data（squaues）

2.2.2　体内释放与吸收分布 PBPK　左羟丙哌嗪属于高溶解、高渗透的 BCS Ⅰ类药物[21]。根据左羟丙哌嗪的理化性质及药动学参数，采用验证后左羟丙哌嗪 PK 模型，借助机制性口服吸收模型（GastroPlus 的 ACAT 模型）反推得到左羟丙哌嗪在胃肠道中的释放与吸收曲线，以及胃肠道的局部吸收特征。根据图 2 和图 3，可知左羟丙哌嗪主要吸收部位在十二指肠和小肠；左羟丙哌嗪体内释放与吸收曲线比较显示，且其吸收量低于吸收部位的释放量，且药物会在 0.5 h 后到达该部位，与文献[16]中记载的 t_{max} 结果基本相符。

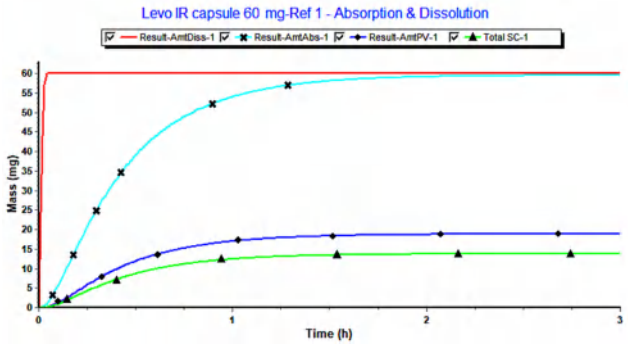


图 2　左羟丙哌嗪胶囊在体内的释放与吸收曲线

Fig 2　In vivo release and absorption curve of levodropropizine capsule

2.2.3　体外溶出与体内的相关性　在左羟丙哌嗪胶囊的质量评估中，筛选和评估了一些溶出条件并用于考察各制剂的体外溶出行为差异，拟合结

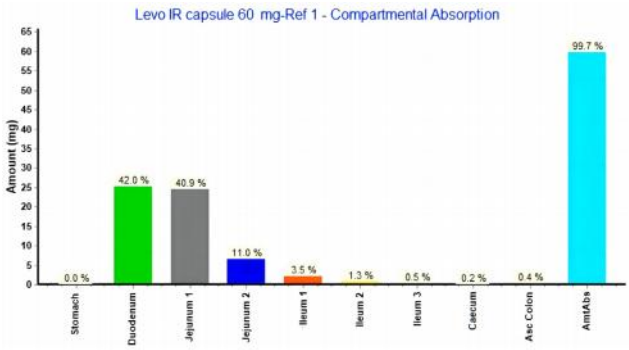


图 3　PBPK 模型预测吸收分布图

Fig 3　Plot of the absorption distribution predicted by the PBPK model

果显示，预测的 C_{max} 和 AUC 与实测数值基本接近，偏差在 ±10% 的范围内（见图 4）。实测数据与体内的释放曲线相比，发现该药溶出条件可以很好地预测体内释放。

2.2.4　建模预测体外溶出释放特性以及体内药动学的影响　采用不同取样时间以及释放量拟合左羟丙哌嗪胶囊在 1 h 内的不同释放速率曲线，分别采用 15、30、40、45 min 内释放 85%，代入 PK 模型中进一步预测不同释放速率对体内左羟丙哌嗪胶囊药动学的影响。以取样时间以及释放量拟合左羟丙哌嗪胶囊在 1 h 内的不同释放速率曲线，见图 5。

分别考察 15、30 和 40 min 取样时间内释放 85% 时药动学参数，C_{max} 偏差都在 ±5% 的范围内；45 min 内释放 85%，C_{max} 偏差超出 ±5% 的范围（见

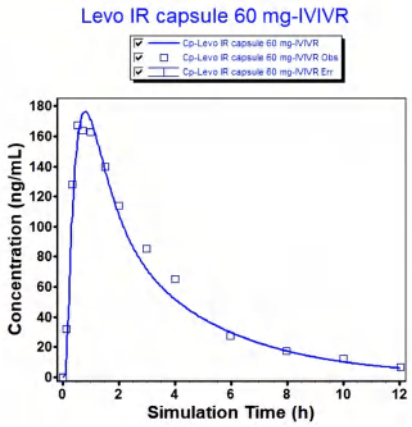


图 4 体外溶出与体内 PBPK 模型预测对比图

Fig 4 Comparison plot of in vitro dissolution and in vivo PBPK model predictions

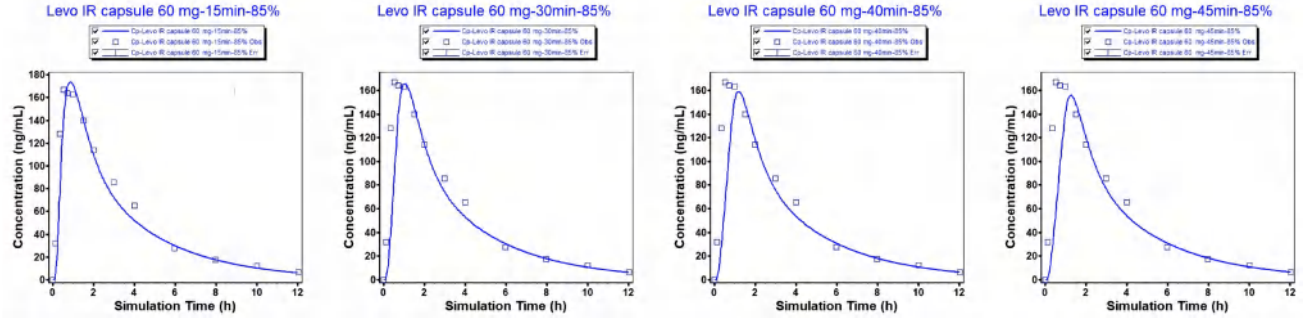


图 5 利用所构建的模型预测不同释放速率下左羟丙哌嗪胶囊的吸收分布图

Fig 5 Constructed model was used to predict the absorption distribution map of levodropropizine capsules at different release rates

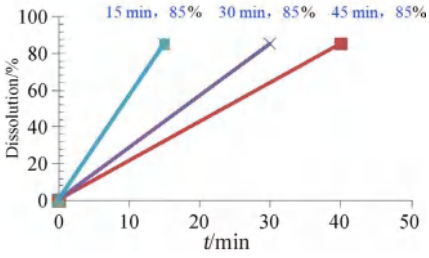


图 6 药物在胃肠道中不同的释放速率

Fig 6 Different release rates of the drug in the gastrointestinal tract

批胶囊制剂（厂家 A，Test 1，批号：220101，规格：60 mg；厂家 B，Test 2，批号：20210404，规格：60 mg；厂家 C，Test 3，批号：D2111231，规格：30 mg）开展体外溶出检查。经 Weibull 方程转化后的释放曲线，代入到已经验证的左羟丙哌嗪胶囊基础 PK 模型中，进行体内 PK 曲线的预测。分别预测仿制制剂对应的人体 PK 曲线，并得到相应的 PK 参数，各个制剂的 PK 曲线和主要 PK 参数见图 7。3 个仿制药的 PK 参数大体相近，C_{max} 和 *AUC* 的比值表现出 ±5% 左右差异，提示不同厂家的左羟丙哌嗪胶囊体外溶出差异未影响体内药动学特征，各个制剂间可保持生物等效。

图 6）。将释放速率曲线加入模型预测，假设给药人群、生理条件等变异变化情况下，T85% = 40 min，C_{max}、*AUC* 等药动学参数在偏差范围内。现行质量标准选择水作为溶出介质，采用 20 min 内释放 80% 的限度作为制剂体外溶出考察的要求，能满足体内药动学参数要求。根据生物药剂处置分类系统，左羟丙哌嗪为易溶解、高渗透药物。经评估，当药物在体内表现较慢的释放行为时，可能会增加峰浓度而导致风险 [21]。

2.2.5 上市仿制药 PK 曲线模拟及探讨 采用溶出度测定法第一法，以 1000 mL 水为溶出介质，转速为 50 r • min^{-1}，取样点为 3、5、8、10、15、20、25、30、45、60 min。对 3 个厂家的 3

3 讨论

人体生理性质中对于分布体积，一般以静脉给药后的 PK 曲线经非房室模型计算处理后，得到的分布体积较为合理。但由于该药没有上市的静脉给药制剂，因此无法获得准确的分布和清除数据。本研究采用 GastroPlus 软件的 PBPK 模型可以结合药物的理化性质参数，机体的生理学参数，通过内建的公式进行计算得到药物在体内的分布特征。组织 / 血浆分配系数的计算公式 [软件默认的 Lukacova（Rodgers-Single）] 并结合相关的建模参数，计算得到人体内的分布体积。

该软件在建立药物的体内外相关性、进行虚拟生物等效性等试验判断生物豁免性等方面均得到了较为广泛的应用 [22]。由于国产左羟丙哌嗪胶囊体外溶出呈快速溶出以及口服模型预测其吸收量低于释放量的特点，结合分析预测，现有国产左羟丙哌嗪胶囊口服吸收基本不受体外溶出差异的影响，PK/PD 显示左羟丙哌嗪胶囊的快速溶解有利于其在体内迅速释放吸收，是发挥药效的有利因素。该研究为没有参比制剂的其他类似品种开展质量 - 疗效一致性评价工作提供了参考与借

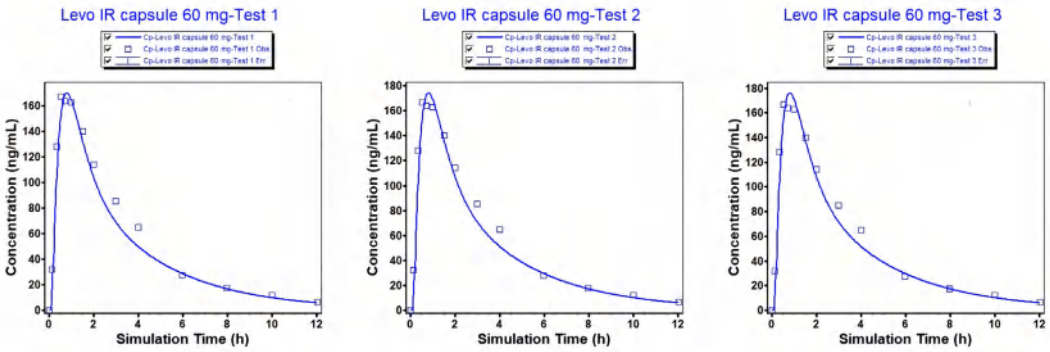


图 7　3 个厂家的平均 PK 曲线

Fig 7　Average PK curves of the 3 manufacturers

鉴，减少了生物等效性试验带来的经济负担，亦可缩短药物的研发周期，减低制剂生物不等效的风险，同时为患者安全用药提供了质量保证。

参考文献

[1] Malandrino S，Melillo G，Bestetti A，et al. Antitussive properties of levodropropizine [J]. Arzneim Forsch，1988，38（8）：1141-1143.

[2] Munt PL，Clavenna G，Algate DR，et al. Antitussive effects of levodropropizine in the dog [J]. Arzneim Forsch，1994，44（2）：153-155.

[3] Lavezzo A，Melillo G，Clavenna G，et al. Peripheral site of action of levodropropizine in experimentally-induced cough：role of sensory neuropeptides [J]. Pulm Pharmacol，1992，5（2）：143-147.

[4] Shams H，Daffonchio L，Scheid P. Effects of levodropropizine on vagal afferent C-fibres in the cat [J]. Br J Pharmacol，1996，117（5）：853-858.

[5] Melillo G，Lavezzo A，Bestetti A，et al. Levodropropizine（DF 526），a new antitussive compound with antiallergic property [J]. Pharmacol Res Commun，1988，20：238.

[6] Chow EC，Talattof A，Tsakalozou E，et al. Using physi-ologically based pharmacokinetic（PBPK）modeling to evaluate the impact of pharmaceutical excipients on oral drug absorption：sensitivity analyses [J]. AAPS J，2016，8（6）：1-12.

[7] Jones HM. Industry perspective of FDA PBPK guidance and EMA PBPK guideline：report from IQC [J]. Drug Metab Pharmacokinet，2018，33（1）：S8.

[8] Kesisoglou F. The role of physiologically based oral absorption modelling in formulation development under a quality by design paradigm [J]. J Pharm Sci，2017，106（4）：944-949.

[9] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：190-191.

[10] FDA. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on abiophar-maceutics classification system guidance for industry [EB/OL]. [2015-05-04]/[2017-12-22]. https：//www. Fda. gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation / guidances / UCM070246. pdf.

[11] Jeon S，Lee J，Hong T，et al. Pharmacokinetics and safety of levodropropizine controlled release tablet after repeated dosing in healthy male volunteers [J]. Journal of Korean Society for Clinical Pharmacology & Therapeutics，2013，21（2）：113-119.

[12] 朱运贵，肖轶雯，雷志强 . 左羟丙哌嗪的人体药动学研究 [J]. 医学临床研究，2005，22（11）：1578-1581.

[13] Villiger A，Stillhart C，Parrott N，et al. Using physiologically based pharmacokinetic（PBPK）modelling to gain insights into the effect of physiological factors on oral absorption in paediatric populations [J]. AAPS J，2016，18（4）：933-947.

[14] Huang SM，Abernethy DR，Wang Y，et al. The utility of modeling and simulation in drug development and regulatory review [J]. J Pharm Sci，2013，102（9）：2912-2923.

[15] 高洪志，梁宇光，郝光涛，等 . 左羟丙哌嗪含片人体药动学研究 [J]. 中国新药杂志，2008，17（16）：1443-1447.

[16] 张相林，李凯鹏，丁庆明 . 左羟丙哌嗪片剂人体生物等效性研究 [J]. 中国新药杂志，2006，15（11）：916-919.

[17] 毕津莲，李湘斌 . HPLC 法测定左羟丙哌嗪片血药浓度 [J]. 中国现代医学杂志，2005，15（12）：1888-1890.

[18] 肇丽梅，赵立，孙亚欣，等 . LC/MS/MS 法测定血浆中左羟丙哌嗪浓度及其药代动力学 [J]. 药学学报，2004，39（12）：993-996.

[19] Benet LZ，Broccatelli F，Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs [J]. AAPS J，2011，13：519-547.

[20] Heimbach T，Xia B，Lin T，et al. Case studies for practical food effect assessments across BCS/BDDCS class compounds using in silico，in vitro，and preclinical in vivo data [J]. AAPS J，2013，15（1）：143-158.

[21] 丁强，金波，管志美，等 . 塞来昔布胶囊体内外相关性的研究 [J]. 中南药学，2022，20（8）：1810-1815.

[22] 潘瑞雪，高源，陈万里，等 . 溶出度试验结合计算机模拟技术评价国产阿莫西林胶囊的生物等效性 [J]. 药学学报，2014，49（8）：1155-1161.

（收稿日期：2022-10-14；修回日期：2023-04-10）

小儿黄龙颗粒对注意力缺陷多动障碍大鼠的干预作用及机制研究

伍永鸿，刘嘉琦，田骄，欧文静，黄喜燕，高佳慧，黄日康，张硕峰*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 研究小儿黄龙颗粒对注意力缺陷多动障碍（ADHD）模型动物的干预作用及作用机制。**方法** 采用幼龄自发性高血压大鼠（SHR）作为 ADHD 模型大鼠，将 32 只健康 SHR 大鼠按体重随机分为 4 组，即 SHR 大鼠组，小儿黄龙颗粒 1.88、3.75 g·kg^{-1} 组，哌甲酯组，另设 WKY 大鼠组、Wistar 大鼠组，每组 8 只，连续灌胃给药 21 d。以自主活动度、焦虑程度、社交偏好程度、易激惹程度、空间记忆能力、注意定势转移能力作为 ADHD 行为学指标；以超高效液相色谱 - 质谱（UPLC-MS/MS）方法检测大鼠大脑内前额叶中多巴胺（DA）、高香草酸（HVA）的含量；以 PCR 方法检测大鼠前额叶内酪氨酸羟化酶（TH）、多巴胺转运体（DAT）mRNA 的表达量。**结果** 3.75 g·kg^{-1} 小儿黄龙颗粒可改善 ADHD 模型大鼠的行为学异常，显著提高大鼠前额叶 DA 含量（$P < 0.01$）、降低 HVA 含量（$P < 0.05$），明显促进前额叶 TH mRNA、DAT mRNA 的表达（$P < 0.01$）。**结论** 小儿黄龙颗粒能改善 ADHD 模型大鼠的行为学障碍，其作用机制与改善多巴胺能神经功能有关。

关键词：注意力缺陷多动障碍；小儿黄龙颗粒；神经递质；行为学
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1738-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.008

Intervention and mechanism of Xiao'er Huanglong granules on rats with attention deficit hyperactivity disorder

WU Yong-hong, LIU Jia-qi, TIAN Jiao, OU Wen-jing, HUANG Xi-yan, GAO Jia-hui, HUANG Ri-kang, ZHANG Shuo-feng* (*School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488)

Abstract: Objective To observe the intervention of Xiao'er Huanglong granules on rats with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and analyze the mechanism. **Methods** Young spontaneously hypertensive rats (SHR) were used to establish ADHD models. Totally 32 healthy SHR rats were randomized into 4 groups according to the body weight, an SHR group, Xiao'er Huanglong granule 1.88 and 3.75 g·kg^{-1} groups and a methylphenidate group. while a WKY group and Wistar group were also set up, with 8 rats in each group. The rats were given Xiao'er Huanglong granules by gavage for 21 days. The degree of autonomous activity, anxiety, social preference, irritability, spatial memory ability and attention set transfer ability were used as the behavioral indicators of ADHD. The levels of dopamine (DA) and homovanillic acid (HVA) in the prefrontal cortex of the rats were detected by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The expressions of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter (DAT) mRNA in the prefrontal cortex of the rats were detected by PCR. **Results** Xiao'er Huanglong granules (3.75 g·kg^{-1}) significantly improved the behavioral abnormalities of ADHD model rats, significantly increased the level of DA ($P < 0.01$), reduced the level of HVA ($P < 0.05$), and promoted the expression of

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81973492）。
作者简介：伍永鸿，男，在读硕士研究生，主要从事中药神经药理学研究，email：1285951841@qq.com *通信作者：张硕峰，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事中药药理学研究，email：shuofengzhang@sina.com

TH mRNA and DAT mRNA in the prefrontal cortex ($P < 0.01$). **Conclusion** Xiao'er Huanglong granules can improve the behavioral disorder in ADHD model rats, whose mechanism is related to the improvement of dopaminergic neurological function.

Key words: attention deficit hyperactivity disorder; Xiao'er Huanglong granule; neurotransmitter; behavior

注意力缺陷多动障碍（attention deficit hyperactivity disorder，ADHD）是常见的儿童神经发育性疾病之一，其三大核心症状为注意力不集中、活动过度和行为冲动。本病在全球内的患病率约为 5%，而在我国儿童及青少年中的患病率为 4.9% ～ 6.6%[1]，且近年患病率有递增的趋势。针对本病，目前临床以哌甲酯、托莫西汀等作为一线用药，但其具有潜在成瘾性，且易诱发抽动、食欲抑制等情况[2]，临床应用具有一定的局限性。

小儿黄龙颗粒是目前唯一一个由国家食品药品监督管理局批准的治疗 ADHD 的中成药。在陈瑶[3]的研究中发现，ADHD 患儿在使用 6 周小儿黄龙颗粒治疗后，口干咽燥、手足心热、盗汗、失眠多梦及大便秘结积分均显著降低；武金霞等[4]发现小儿黄龙颗粒治疗 ADHD 的有效率高达 97.44%。但目前存在的问题是，小儿黄龙颗粒改善患儿行为障碍的作用特点尚不清晰，关键机制尚不明确。

为了进一步观察小儿黄龙颗粒治疗 ADHD 的作用特点，本研究通过检测模型大鼠前额叶单胺类神经递质多巴胺（dopamine，DA）及其代谢物高香草酸（homovanillic acid，HVA）的含量，并以 DA 合成关键因子酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）及再摄取关键因子多巴胺转运体（dopamine transporter，DAT）为切入点，探讨小儿黄龙颗粒对 ADHD 的作用机制。

1　材料

1.1　实验动物

SPF 级 SHR 大鼠 32 只，雄性，2 周龄，体质量 45 ～ 60 g；SPF 级同源正常血压大鼠（Wistar-kyoto，WKY）大鼠 8 只，雄性，2 周龄，体质量 45 ～ 60 g；SPF 级 Wistar 大鼠 8 只，雄性，2 周龄，体质量 45 ～ 60 g [斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证编号：SCXK（京）2019-0010。动物合格证号分别为，SHR 大鼠：110324211105414141、110324111062247 26、110324211107114176、110324221101360268，WKY 大鼠：110011211111739136、110011211113633112，Wistar 大鼠：110324111054144 38、110324211062248 24、110324221100380874、110324221101959716]。室温为（23±2）℃，相对湿度为（65±5）%，给药前使动物先适应性饲养 2 d，自由摄取食水，并且实验过程中对动物的操作符合医学动物伦理学标准。

1.2　试药

小儿黄龙颗粒（重庆希尔安药业有限公司，规格：5 g/ 袋，批号：201002）。临床用量：6 ～ 9 岁，一次一袋，一日两次；10 ～ 14 岁一次两袋，一日两次。按 12 岁体质量 32 kg 计算，用量为 0.156 25 g • kg^{-1}，大鼠剂量按照人用量的 6、12 倍计算，即 1.88、3.75 g • kg^{-1}）。盐酸哌甲酯缓释片（西安杨森制药有限公司，规格：36 mg，批号：0KE654），临床用量为 36 mg，服用年龄为 6 ～ 12 岁，故按 12 岁体质量 32 kg 计算，用量为 1.125 mg • kg^{-1}，大鼠剂量按人用量的 6 倍计算，即 6.75 mg•kg^{-1}。戊巴比妥钠（北京化学试剂公司，批号：020402）。总 RNA 提取剂（批号：94604，Ambion）；三氯甲烷（批号：20150282，北京试剂）；异丙醇（批号：C12499815，Macklin）；乙醇（批号：2110211025，JING CHUN）；无酶水（批号：SL311437100，Coolaber）；逆转录试剂盒（NovoScriptRPlus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix（gDNA Purge，批号：05227808）、qPCR 试剂盒（NovoStartRSYBR qPCR SuperMix Plus，批号：05229413）（Novoprotein）；多巴胺（纯度：98%，批号：S14GB161091）、高香草酸（纯度：98%，批号：N16GB168232）、去甲肾上腺素（纯度：99%，批号：H20N11C130929）、5- 羟色胺（纯度：98%，批号：F25F7E10127）、5- 羟吲哚乙酸（纯度：98%，批号：J14HB187275）、2- 吡啶乙酸盐酸盐（纯度：97%，批号：A16D10S105869）（源叶生物）；3- 甲氧基 -4- 羟基苯乙二醇（纯度：98%，批号：2-ACH-121-4，TRC）；甲酸（批号：20170220）、乙腈（批号：F22M51202）（天津市福晨化学试剂厂）。

1.3　仪器

AR1140/C 型电子分析天平（上海奥豪斯公司）；Ethovision XT 9.0 动物行为跟踪仪（荷兰 Noldus 公司）；5810R 高速常温 / 冷冻离心机（德国艾本德公司）；Milli-Q 型超纯水系统（北京五洲东方科技发展有限公司）；ND one 超微量紫外可见分光光度计（美国 Thermo 公司）；StepOnePlusR

实时型定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）；液相 - 质谱联用分析系统（LC-MS/MS）AcQuity UPLC 系列液相仪、UPLC 系统工作软件 Empower（美国 Waters 公司）；API 5500 Qtrap 质谱仪、质谱仪系统工作软件 Analyst 1.62（美国 AB Sciex 公司）；－ 70 ℃超低温冰箱（中国 Haier 集团公司）；台式离心机（德国 Thermo Fisher 公司）；T18 Basic 高速分散机、Vibrax VXR 小型摇床、MS3 Basic 涡旋混合器（德国 IKA 公司）；注意定势转移测试箱（中国阔云仪器设备有限公司）。

2 方法

2.1 分组与给药

将 SHR 大鼠按体质量随机分为 4 组，每组 8 只，即 SHR 大鼠组，小儿黄龙颗粒 1.88、3.75 $g \cdot kg^{-1}$ 组，哌甲酯组，另 8 只 WKY 大鼠为一组，8 只 Wistar 大鼠为一组，用作 SHR 大鼠的正常对照组。小儿黄龙颗粒 1.88 $g \cdot kg^{-1}$ 组和小儿黄龙颗粒 3.75 $g \cdot kg^{-1}$ 组灌胃小儿黄龙颗粒溶液，每日两次，哌甲酯组给予盐酸哌甲酯缓释片 6.75 mg/（kg•d），连续 21 d，其余各组灌胃等量生理盐水。

2.2 观察指标

2.2.1 自主活动程度 在给药第 16 日晚 8：00 进行大鼠自主活动的检测，实验时，将大鼠放入旷场实验箱中（44 cm×44 cm×54 cm），首先适应环境 1 min，再观测 30 min。所得视频文件用 Noldus 动物行为跟踪仪 EthoVision XT 9.0 软件进行分析。分别记录每只大鼠的行为学指标（移动总距离、移动速度、中心区域时间、中心区域路程、活动连续性）。

2.2.2 社交偏好程度 在给药第 17 日 20：00 将大鼠放入三箱社交装置箱中进行社交偏好实验，提前将陌生鼠放入装置的一侧，另一侧不放入大鼠作为空白侧。实验时，使动物首先适应环境 1 min，再观察 30 min。检测指标：待测动物陌生鼠侧区域时间，以及陌生鼠侧区域时间百分比。

2.2.3 易激惹程度 给药第 20 日进行激惹实验，通过测量攻击性反应来检测类似易怒的行为，其具体操作和统计方法详见参考文献 [5]。

2.2.4 注意定势转移能力 给药第 19 ～ 21 日进行注意定势转移任务（AST）测试，为维持动物保持一定的饥饿状态，将给食量控制在正常食量的 70% 左右。AST 测试具体操作方法及程序详见参考文献 [6]。

2.2.5 空间记忆能力 巴恩斯迷宫实验分为学习过程（第 16 ～ 18 日）和检测过程（第 19 日），期间以光刺激作为驱动小鼠进入目标洞口的动机，其具体训练方法与检测方式详见参考文献 [7]。

2.2.6 Real-time PCR 检测前额叶皮质 TH mRNA、DAT mRNA 表达 按实验操作步骤提取前额叶总 RNA，分析纯度、检测浓度后逆转录，96 孔板加样，离心 10 min，注意避光，放入荧光 PCR 仪进行荧光定量 PCR 实验，扩增条件：保持阶段：95 ℃ 10 min；循环阶段：95 ℃ 20 s，60 ℃ 1 min，循环 40 次；溶解曲线阶段：95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s。描绘溶解曲线，重复 3 次，对 CT 值进行统计分析。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab 1 Real-time fluorescent quantitative PCR primer sequence

基因	正向	反向
TH	5'-ACACAGCGGAAGAGATTGCT-3'	5'-AGCCACAGTACCGTTCCAGA-3'
DAT	5'-CTACCTGCTCTTCATGGTTATTG-3'	5'-CCACGTAGAAAGAGATGAGGATA-3'
GAPDH	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	5'-ACTGTGGTCATGAGCCCTTC-3'

2.2.7 UPLC-MS/MS 检测大鼠前额叶内单胺类神经递质 DA 及其代谢物 HVA 含量 将大鼠前额叶按质量加入 4 倍质量超纯水匀浆，保存于－ 70 ℃冰箱备用。精密吸取组织匀浆液 100 μL，加入 300 μL 甲醇（含 0.1% 甲酸），3000 $r \cdot min^{-1}$ 涡旋 5 min，冰水浴超声 5 min，12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 后，取上清液 300 μL 在真空浓缩仪中吹干，然后加入 100 μL 复溶溶液（初始流动相比例），3000 $r \cdot min^{-1}$ 涡旋 5 min，冰水浴超声 5 min，12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 后，取上清液进样 5 μL 分析。色谱检测条件、质谱检测条件及具体操作方法详见参考文献 [8]。

3 结果

3.1 对 ADHD 模型大鼠自主活动的影响

结果如表 2 所示，SHR 大鼠的移动总距离、移动速度、活动连续性均明显高于 Wistar 大鼠（$P < 0.01$）；WKY 大鼠与 Wistar 大鼠各指标无明显差异，提示幼年 SHR 大鼠具有多动、焦虑的特性。与 SHR 大鼠组相比，小儿黄龙颗粒（3.75 $g \cdot kg^{-1}$）可显著降低 SHR 大鼠的移动总距离、移动速度和活动连续性（$P < 0.01$）；小儿黄龙颗粒组（1.88 $g \cdot kg^{-1}$）对其改善程度降低；哌甲酯能显著降低 SHR 大鼠的活动连续性（$P < 0.05$），其余各指标差异均无统计学意义。

表 2　小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠自主活动的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Effect of Xiao'er Huanglong granules on the autonomic activity of ADHD model rats（$\bar{x}\pm s$）

组别	移动总距离 /cm	移动速度 /（cm・s^{-1}）	中心区域时间 /s	中心区域路程 /cm	活动连续性
WKY 大鼠组	3275.15±965.09**	1.82±0.54**	31.58±23.61*	641.84±403.95**	7.25±2.77**
Wistar 大鼠组	4096.13±1139.60**	2.28±0.63**	41.60±53.02	1040.10±666.30	8.16±2.26**
SHR 大鼠组	7104.43±1839.67##	3.95±1.02##	88.68±41.63	1674.00±827.46	13.58±3.68##
小儿黄龙颗粒组 1.88 g・kg^{-1}	6390.45±1537.64##	3.55±0.85##	104.90±36.03#	1893.12±710.59#	11.68±2.43#
小儿黄龙颗粒组 3.75 g・kg^{-1}	5209.77±837.45**	2.89±0.47**	101.40±76.17#	1793.8±717.51#	9.96±2.02**
哌甲酯组	6264.65±613.31##	3.48±0.34##	103.15±38.75#	1993.99±672.88#	10.83±0.89*

注：与 SHR 大鼠组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 Wistar 大鼠组相比，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

Note：Compared with the SHR rat group，*$P<0.05$，**$P<0.01$；compared with the Wistar rat group，#$P<0.05$，##$P<0.01$.

3.2　对 ADHD 模型大鼠社交能力的影响

结果如表 3 所示，SHR 大鼠、WKY 大鼠各指标均明显低于 Wistar 大鼠（$P<0.01$），说明两者均具有一定的社交障碍；而 WKY 大鼠与 SHR 大鼠社交能力无显著差异，故 Wistar 大鼠更适于用作 SHR 大鼠社交实验的正常对照组。小儿黄龙颗粒各剂量均能显著提高 SHR 大鼠与陌生鼠的接触时间（$P<0.05$），提高其社交能力。哌甲酯能不同程度地增加 SHR 大鼠在陌生鼠侧停留时间及时间占比，但效果不显著。

表 3　小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠社交能力的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　Effect of Xiao'er Huanglong granules on the social ability of ADHD model rats（$\bar{x}\pm s$）

组别	陌生鼠侧时间 /s	陌生鼠侧时间占比 /%
Wistar 大鼠组	1135.23±202.14**	256.95±157.97**
WKY 大鼠组	703.70±242.30##	121.01±82.87##
SHR 大鼠组	731.60±276.18##	117.24±68.86##
小儿黄龙颗粒组 1.88 g・kg^{-1}	1038.85±94.11**	225.24±45.32*
小儿黄龙颗粒组 3.75 g・kg^{-1}	963.88±89.30*	181.69±40.64
哌甲酯组	924.80±166.58#	197.66±91.47

注：与 SHR 大鼠组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 Wistar 大鼠组相比，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

Note：Compared with the SHR rat group，*$P<0.05$，**$P<0.01$；compared with the Wistar rat group，#$P<0.05$，##$P<0.01$.

3.3　对 ADHD 模型大鼠空间记忆能力的影响

结果如表 4 所示，WKY 大鼠与 Wistar 大鼠找到目标盒的潜伏期无显著差异，SHR 大鼠的潜伏期低于 Wistar 大鼠，此现象可能与 SHR 大鼠多动、运动速度较快的因素有关，故潜伏期的参考意义不大。而在错误次数方面，SHR 大鼠较 Wistar 大鼠错误次数多，提示其空间记忆能力的降低，小儿黄龙颗粒各剂量以及哌甲酯均能不同程度地降低 SHR 大鼠的错误次数，但差异均无统计学意义。

3.4　对 ADHD 模型大鼠注意定势转移能力的影响

结果如表 5 所示，SHR 大鼠各阶段错误率

表 4　小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠空间记忆能力的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 4　Effect of Xiao'er Huanglong granules on the spatial memory of ADHD model rats（$\bar{x}\pm s$）

组别	潜伏期 /s	错误次数 / 次
Wistar 大鼠组	18.88±3.79	1.71±1.01
WKY 大鼠组	18.08±4.72	1.79±1.08
SHR 大鼠组	14.29±4.79	2.21±1.37
小儿黄龙颗粒组 1.88 g・kg^{-1}	14.08±4.95	1.75±1.42
小儿黄龙颗粒组 3.75 g・kg^{-1}	15.21±7.00	1.79±1.57
哌甲酯组	14.25±5.82	1.67±1.46

注：与 SHR 大鼠组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 Wistar 大鼠组相比，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

Note：Compared with the SHR rat group，*$P<0.05$，**$P<0.01$；compared with the Wistar rat group，#$P<0.05$，##$P<0.01$.

均不同程度地高于 Wistar 大鼠，尤其复杂辨别（CD）正向学习阶段、外维度转换（EDS）反向学习阶段差异明显（$P<0.05$），WKY 大鼠与 Wistar 大鼠无显著差异，提示 SHR 大鼠存在注意定势转移障碍。小儿黄龙颗粒各剂量能不同程度地降低 SHR 大鼠各阶段的错误率，尤其在 CD 正向阶段、内维度转换（IDS）正向阶段、EDS 的反向学习阶段作用明显（$P<0.05$），提示小儿黄龙颗粒可提高 SHR 大鼠的学习与认知能力，有效改善 SHR 大鼠注意定势转移障碍；哌甲酯能显著降低 SHR 大鼠在 CD 正向阶段、EDS 的反向学习阶段的错误率（$P<0.05$）。

3.5　对 ADHD 模型大鼠易激惹程度的影响

结果如表 6 所示，SHR 大鼠攻击行为总次数明显高于 Wistar 大鼠（$P<0.01$），WKY 大鼠与 Wistar 大鼠无显著差异，提示 SHR 大鼠易被激怒，与临床 ADHD 患儿冲动、急躁易怒的行为特征相符。小儿黄龙颗粒各剂量以及哌甲酯均能显著降低 SHR 大鼠攻击行为总次数（$P<0.05$），改善其易怒特征。

3.6　对 ADHD 模型大鼠前额叶 TH mRNA、DAT mRNA 表达的影响

结果如表 7 所示，SHR 大鼠前额叶 TH mRNA、

表 5 小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠注意定势转移能力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 5 Effect of Xiao'er Huanglong granule on the attention setting transfer ability of ADHD model rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	SD 阶段 /%	CD 阶段 /%		IDS 阶段 /%		逆反学习（RL）阶段 /%		EDS 阶段 /%	
		正向	反向	正向	反向	正向	反向	正向	反向
WKY 大鼠组	5.53±5.79	6.47±6.50*	3.04±5.37	10.62±6.29	5.13±6.65	6.70±6.73	3.89±7.09	5.36±6.92	7.91±8.35
Wistar 大鼠组	3.83±6.07	4.24±6.71**	1.59±3.89	6.12±7.07	5.06±5.96	3.63±5.80	3.57±8.75	4.24±6.71	4.31±5.01*
SHR 大鼠组	6.69±9.43	14.11±6.69$^{\#\#}$	5.31±7.15	12.61±5.8	10.98±9.17	10.50±9.71	4.69±8.70	9.56±8.06	11.7±7.59$^{\#}$
小儿黄龙颗粒组 1.88 g·kg^{-1}	6.66±7.41	6.38±6.50*	3.13±5.41	1.56±4.13**	7.56±6.19	6.52±6.59	1.79±4.72	5.13±6.65	1.25±3.31**
小儿黄龙颗粒组 3.75 g·kg^{-1}	2.04±5.00	2.04±5.00**	1.43±3.50	7.71±6.76	7.30±6.46	6.68±5.95	3.57±8.75	5.36±9.11	10.51±6.83
哌甲酯组	8.53±7.77	3.83±6.07**	3.08±4.96	8.82±7.96	5.06±5.96	10.88±11.30	5.87±6.80	3.02±4.78	3.08±4.96*

注：与 SHR 大鼠组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 Wistar 大鼠组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：Compared with the SHR rat group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the Wistar rat group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

表 6 小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠攻击性行为的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 6 Effect of Xiao'er Huanglong granule on the aggressive behavior of ADHD model rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	攻击行为总和 / 次
WKY 大鼠组	5.75±1.98*
Wistar 大鼠组	3.13±1.76**
SHR 大鼠组	8.13±2.93$^{\#\#}$
小儿黄龙颗粒组 1.88 g·kg^{-1}	5.38±2.18*
小儿黄龙颗粒组 3.75 g·kg^{-1}	4.75±2.63**
哌甲酯组	4.75±2.05**

注：与 SHR 大鼠组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 Wistar 大鼠组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：Compared with the SHR rat group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the Wistar rat group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

DAT mRNA 的表达量明显低于 Wistar 大鼠与 WKY 大鼠（$P<0.01$）。小儿黄龙颗粒（1.88 g·kg^{-1}）能显著提高 SHR 大鼠前额叶 TH mRNA 的表达（$P<0.01$），小儿黄龙颗粒（3.75 g·kg^{-1}）、哌甲酯能显著提高 SHR 大鼠前额叶 TH mRNA、DAT mRNA 的表达（$P<0.05$）。

表 7 小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠大脑前额叶中 TH mRNA、DAT mRNA 相对含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 7 Effect of Xiao'er Huanglong granule on the TH mRNA and DAT mRNA relative content in the prefrontal cortex of ADHD model rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	TH	DAT
WKY 大鼠组	0.88±0.08$^{**\#\#}$	0.56±0.10$^{*\#\#}$
Wistar 大鼠组	1.00±0.09**	1.01±0.16**
SHR 大鼠组	0.51±0.05$^{\#\#}$	0.42±0.02$^{\#\#}$
小儿黄龙颗粒组 1.88 g·kg^{-1}	0.70±0.06$^{**\#\#}$	0.44±0.10$^{\#\#}$
小儿黄龙颗粒组 3.75 g·kg^{-1}	1.07±0.06**	0.58±0.06$^{**\#\#}$
哌甲酯组	1.14±0.10$^{**\#\#}$	0.54±0.17$^{*\#\#}$

注：与 SHR 大鼠组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 Wistar 大鼠组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：Compared with the SHR rat group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the Wistar rat group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

3.7 对 ADHD 模型大鼠前额叶 DA、HVA 含量的影响

结果如表 8 所示，SHR 大鼠前额叶中 DA 含量低于 Wistar 大鼠，而 HVA 含量显著高于 Wistar 大鼠（$P<0.01$），WKY 大鼠与 Wistar 大鼠间两递质含量无显著差异。小儿黄龙颗粒（3.75 g·kg^{-1}）能显著提高 SHR 大鼠前额叶中 DA 含量（$P<0.01$），降低 HVA 含量（$P<0.05$）；哌甲酯能显著提高 SHR 大鼠前额叶中 DA 含量（$P<0.01$）。

表 8 小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠大脑前额叶中 DA、HVA 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 8 Effect of Xiao'er Huanglong granule on the content of DA and HVA in the prefrontal cortex of ADHD model rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	DA/（ng·g^{-1}）	HVA/（ng·g^{-1}）
WKY 大鼠组	465.14±16.52	161.27±59.64*
Wistar 大鼠组	462.67±9.43	121.56±26.22**
SHR 大鼠组	457.50±17.99	271.77±78.33$^{\#\#}$
小儿黄龙颗粒组 1.88 g·kg^{-1}	472.44±13.12	287.69±148.37$^{\#\#}$
小儿黄龙颗粒组 3.75 g·kg^{-1}	487.33±24.49$^{**\#\#}$	178.55±79.53*
哌甲酯组	532.57±21.37$^{**\#\#}$	321.57±75.29$^{\#\#}$

注：与 SHR 大鼠组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 Wistar 大鼠组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：Compared with the SHR rat group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the Wistar rat group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

4 讨论

ADHD 常伴随学习与记忆障碍、品行异常、对立违抗障碍等精神类疾病[9]，对个人成长、家庭生活和社会关系产生持久的损害，在儿科界引起了广泛重视。目前临床使用的药物大多具有潜在成瘾性，且易伴随呕吐等不良反应，而其他非药物治疗手段在实际治疗中亦存在一定的局限性，因此寻求安全、有效、绿色的治疗成为临床 ADHD 患者的迫切需要。近年来，国内研究发现中医药在治疗 ADHD 中有着显著优势，成为临床患者的新选择。

小儿黄龙颗粒作为治疗 ADHD 的常用中成药，方中白芍、熟地黄和麦冬共为君药，三药协同作用，起滋阴补血，安神定志，平肝潜阳的作用，能显著改善患儿多动不宁、神思涣散、性急易怒等症状[10]。鉴于小儿黄龙颗粒在治疗 ADHD 方面的显著疗效，故本研究拟采用 ADHD 大鼠作

为动物模型，观察小儿黄龙颗粒对其行为学方面的干预特点，并探讨其作用机制。

本研究选取的幼年 SHR 大鼠为国际上应用最广泛、研究最多、较为理想的 ADHD 动物模型，其起源于东京远交系 Wistar 大鼠，是 Okamoto 等 [11] 在 WKY 大鼠的基础上，经过交叉培育而成，由于年幼动物常表现出多动、冲动、注意力不集中等特点，故用作研究 ADHD 的动物模型。实验时常将 WKY 大鼠作为 SHR 大鼠的天然对照组，但因其比其他品系大鼠自主活动低，在旷场实验中活动度下降，在水迷宫实验中易漂浮不动，表现出抑郁样的特征 [12]，其行为特征与 SHR 大鼠的比较缺乏客观真实性，故本研究增设 Wistar 大鼠组，用作 SHR 大鼠的正常对照组。

ADHD 患者存在多动、冲动、注意力不集中的症状，倾向于在工作中表现出执行障碍、内心焦虑，以及不同程度的认知障碍、学习困难和社交障碍 [13]。本研究结果表明，SHR 大鼠能较好地模拟临床 ADHD 患儿的行为学异常，小儿黄龙颗粒能显著降低其自主活动程度、提高社交能力，改善其注意定势转移障碍，并能明显缓解其急躁易怒和焦虑的状态，但对其空间记忆能力的提升作用不强。

从神经系统的解剖及功能来看，前额叶皮质与注意力的持续和调节、情绪、行为有密切关系。研究认为，ADHD 潜在病理生理学机制的主要假设是基于单胺类神经功能障碍，DA 作为单胺类神经中最具活性的神经递质，在前额叶皮质的功能发挥中具有重要意义 [14]。在 DA 的合成过程中，TH 是参与 DA 合成的起始酶和限速酶；而 DAT 是位于多巴胺神经突触前膜特异性的跨膜蛋白，属于 Na^+/Cl^- 离子依赖型转运蛋白基因家族，可使 DA 在突触扩散之前迅速灭活 [15]。综上，本研究围绕多巴胺能神经通路，选取前额叶内 DA 及其代谢物 HVA 作为检测物质，并通过检测其合成与再摄取相关因子 TH mRNA、DAT mRNA 的表达，探究小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠的作用机制。

研究表明，SHR 大鼠前额叶内 DA 含量较 Wistar 大鼠低，而 HVA 的含量显著升高，提示 SHR 大鼠存在 DA 的合成与代谢紊乱，多巴胺能神经失调，进而影响其注意力、情绪和行为，与前面 SHR 大鼠行为异常的结果吻合；进一步的研究表明，SHR 大鼠前额叶内 TH mRNA、DAT mRNA 表达较 Wistar 大鼠显著降低，故造成 DA 的合成障碍以及再摄取异常，与神经递质的检测结果一致。小儿黄龙颗粒能显著提高前额叶 TH mRNA 的表达，增加 DA 的合成；并通过提高 DAT mRNA 的表达，实现突出前膜对 DA 的再摄取，从而增加前额叶 DA 含量，降低 HVA 含量。

综上，小儿黄龙颗粒对 ADHD 模型大鼠的行为学异常具有明显的改善作用，其作用机制与其能提高前额叶 TH mRNA、DAT mRNA 表达，进而提高 DA 含量，降低 HVA 含量，改善多巴胺能神经功能相关。

参考文献

[1] Cortese S，Coghill D. Twenty years of research on attention-deficit/hyperactivity disorder（ADHD）：looking back，looking forward [J]. Evid Based Ment Health，2018，21（4）：173-176.

[2] Posner J，Polanczyk GV，Sonuga BE. Attention-deficit hyperacvtivity disorder [J]. Lancet，2020，395（10222）：450-462.

[3] 陈瑶 . 小儿黄龙颗粒治疗儿童注意缺陷多动障碍单臂临床试验 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2018.

[4] 武金霞，武婷婷，高桂香，等 . 小儿黄龙颗粒联合哌甲酯治疗儿童注意缺陷多动障碍的临床研究 [J]. 现代药物与临床，2018，33（5）：1198-1202.

[5] Adam K，Giordano DG，Jenni K，et al. CRF_1 receptor-dependent increases in irritability-like behavior during abstinence from chronic intermittent ethanol vapor exposure [J]. Alcohol Clin Exp Res，2017，4（11）：1886-1895.

[6] 严素玉 . 静宁颗粒对 ADHD 模型动物多动行为、注意缺陷障碍的干预作用及其机制分析 [D]. 北京：北京中医药大学，2017.

[7] 段尚春，卿文祥，王雪琴，等 . 抑制受体相互作用蛋白 1 可改善慢性应激小鼠的认知功能损害 [J]. 解剖学杂志，2018，41（5）：547-552.

[8] 毕欣宁，戚靖，黄运芳，等 . UPLC-MS/MS 同时快速检测大鼠组织及血、尿样品中 8 种神经递质含量 [J]. 中国中药杂志，2019，44（22）：4918-4923.

[9] 张彩峰 . 静宁颗粒对 ADHD 模型大鼠社交行为、空间记忆的影响及机制研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2017.

[10] 万源 . 小儿黄龙颗粒治疗 ADHD 的 30 例Ⅳ期临床试验总结 [D]. 南京：南京中医药大学，2019.

[11] Okamoto K，Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats [J]. Jpn Circ J，1963，27：282-293.

[12] 周荣易，王娇娇，韩新民 . SHR、WKY 大鼠与 SD 大鼠注意缺陷多动障碍模型行为学特征的比较 [J]. 中国实验动物学报，2017，25（4）：380-385.

[13] Ferretti NM，King SL，Hilton DC，et，al. Social functioning in youth with attention-deficit/hyperactivity disorder and sluggish cognitive tempo [J]. Yale J Biol Med，2019，92（1）：29-35.

[14] 宋宇尘，雷爽，韩新民，等 . 安神定志灵对 ADHD 模型动物前额叶 TH、DAT 的影响 [J]. 中成药，2020，42（1）：195-199.

[15] Palermo G，Ceravolo R. Molecular imaging of the dopamine transporter [J]. Cells，2019，8（8）：872.

（收稿日期：2022-10-27；修回日期：2022-11-30）

卷曲乳杆菌类细菌素的分离纯化及表征

邹达，唐美，黄雄辉，邹俊娜，王艳*（中南大学化学化工学院，长沙 410083）

摘要：目的 初步分离纯化并鉴定卷曲乳杆菌类细菌素，为研发针对念珠菌性阴道炎（VVC）的药物奠定基础。**方法** 以氟康唑作为标准药物，测定卷曲乳杆菌发酵上清液（CFS）对于白假丝酵母菌的抑菌活性，研究温度、pH 值和酶解处理对于 CFS 抑菌活性的影响；采用硫酸铵沉淀法、疏水柱层析法及透析法对 CFS 中的抑菌活性物质进行初步分离纯化；采用苯酚 - 硫酸法、双缩脲反应、UV、FTIR、HPLC 和 SDS-PAGE 对抑菌活性物质进行初步鉴定。**结果** 卷曲乳杆菌 CFS 中存在耐酸碱、热稳定性好的糖蛋白或糖肽类抑菌物质，初步纯化之后 CFS 比活力从 218.6 U • mg^{-1} 提升到 700.7 U • mg^{-1}，提高了 3.2 倍，初步鉴定为分子量均为 55 kD 左右的两种糖蛋白或糖肽。**结论** 卷曲乳杆菌 CFS 中含有糖蛋白或糖肽类细菌素，对白假丝酵母菌具有抑制作用，有望将其开发成药物。

关键词：卷曲乳杆菌；类细菌素；分离纯化；表征

中图分类号：R915 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1744-007

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.009

Isolation, purification and characterization of bacteriocin-like substance from *Lactobacillus crispatus*

ZOU Da, TANG Mei, HUANG Xiong-hui, ZOU Jun-na, WANG Yan* (*Chemistry and Chemical Engineering of Central South University, Changsha* 410083)

Abstract: Objective To isolate and identify bacteriocin-like substances produced by the *Lactobacillus crispatus*, and lay the foundation for research and drug development for vulvovaginal candidiasis (VVC). **Methods** Fluconazole was used as the standard drug, the bacteriostatic activity of cell-free supernatant of *Lactobacillus crispatus* (CFS) for *Candida albicans* was determined. The effect of temperature, pH value and enzymatic hydrolysis on the antibacterial activity of CFS was determined. The antibacterial active substances in CFS were preliminarily separated and purified by ammonium sulfate precipitation, hydrophobic column chromatography and dialysis. Phenol-sulfuric acid method, biuret test, UV, FTIR, HPLC and SDS-PAGE were used to identify the antibacterial active substances. **Results** Glycoprotein or glycopeptide antibacterial substances were found with good acid-base resistance and thermal stability in CFS of *Lactobacillus crispatus*. After the purification, the specific activity increased from 218.6 U • mg^{-1} to 700.7 U • mg^{-1}, by 3.2 times. Two glycoproteins with molecular weight of about 55 kD were identified. **Conclusion** CFS of *Lactobacillus crispatus* contains glycoprotein or glycopeptide bacteriocin, which can inhibit *Candida albicans* and as a prospective drug.

Key words: *Lactobacillus crispatus*; bacteriocin-like substance; isolation and purification; characterization

健康女性阴道内定植了大量的微生物，一般分为厌氧、兼性厌氧和需氧微生物[1]。微生物群之间相互制约、相互协调，它们还可以与宿主协作，抵御机会致病菌的生长和定植，而这种健康的平衡，则被称为微生态平衡[2]。有研究表明，菌群失衡与细菌性阴道炎（bacterial vaginitis，BV）、念珠菌性阴道炎（vulvovaginal candidiasis，VVC）等疾病密切相关。

作者简介：邹达，男，在读硕士研究生，主要从事抗菌肽研究，email：2398827090@qq.com *通信作者：王艳，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事抗菌肽研究，email：wy-csu@csu.edu.cn

乳酸杆菌在健康阴道微生物群中最为常见，检出率也最高，且在数量上占主导地位，在阴道液中的菌浓度可达 1×10^7 ～ 1×10^8 CFU·g^{-1}[3]。同时，乳酸杆菌在维持阴道微生态平衡方面扮演着重要角色，主要体现在通过分泌乳酸、过氧化氢以及细菌素等物质去防止机会致病菌的过度繁殖和与机会致病菌竞争在阴道上皮细胞上的黏附位点[4-6]。卷曲乳杆菌是一种阴道内源乳酸杆菌，有体外研究表明[4-5]，健康女性阴道中分离出的卷曲乳杆菌的发酵上清液（cell-free supernatant，CFS），可以通过调控白假丝酵母菌菌丝特异性基因 *HWP1* 和 *ECE1*、黏附相关基因 *ALS3*、生物膜相关基因 *BCR1*、菌丝相关转录因子 *EFG1* 等基因的表达来抑制白假丝酵母菌的生长和菌丝形态形成[6]，并证明对白假丝酵母菌起抑制作用的除了乳酸和过氧化氢外，还有类细菌素。本研究旨在通过离心、硫酸铵沉淀、疏水柱层析和透析的方法对卷曲乳杆菌类细菌素进行分离纯化，并对其性质进行初步探究，为其能否作为治疗 VVC 的药物奠定基础。

1 材料

卷曲乳杆菌（*Lactobacillus crispatus*，CGMCC 1.2743，中国普通微生物菌种保藏管理中心），白假丝酵母菌（*Candida albicans*，ATCC10231，广东省微生物保藏中心），菌种于－80 ℃冰箱保存。*Candida albicans* 使用 YPD 培养基，*Lactobacillus crispatus* 使用 MRS 肉汤培养基，置于无氧、5%CO_2 的条件下孵育。乳清粉（深圳拓建生物科技有限公司）；MRS、YPD 等培养基（青岛海博生物有限公司）；辛基 - 琼脂糖凝胶 CL-4B（北京索莱宝科技有限公司）；硫酸铵、蛋白酶等试剂（上海麦克林生化科技有限公司）。

UV-1801 紫外分光光度计（郑州博邦科贸有限公司）；Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪（美国 Thermo Scientific 公司）；Waters Alliance e2695 高效液相色谱仪（新加坡沃特世有限公司）。

2 方法

2.1 卷曲乳杆菌 CFS 的制备

接种 4% 的 OD_{600} ＝ 1.5 的卷曲乳杆菌至含有 600 mL 乳清培养基（乳清粉 20 g·L^{-1}，葡萄糖 4 g·L^{-1}，磷酸氢二钾 0.75 g·L^{-1}，初始 pH 8.1）的 1 L 三角培养瓶中发酵培养 32 h，发酵液离心得上层清液，过 0.22 μm 微孔滤膜得到 CFS，4 ℃储存备用。

2.2 抑菌活性测试方法及效价的确定

以白假丝酵母菌标准菌株作为指示菌，菌浓度为 1×10^6 CFU·mL^{-1} 进行抑菌实验。将白假丝酵母菌接种至 96 孔板中，加入 CFS（pH 6.5，每个孔各 100 μL），所有实验平行 6 个独立重复实验，37 ℃培养 24 h 后用酶标仪于 600 nm 测定每个孔的 *OD* 值，根据文献计算细菌生长抑制率[6]。

利用 YPD 培养基（20.0 g·L^{-1} 蛋白胨，20.0 g·L^{-1} 葡萄糖，10.0 g·L^{-1} 酵母浸粉，pH 6.5±0.2，25 ℃），将 5 mg·mL^{-1} 氟康唑溶液用二倍稀释法得到质量浓度为 1.0、2.0、3.9、7.8、15.6、31.3、62.5、125、250 μg·mL^{-1} 的氟康唑溶液。根据上述抑菌活性测试方法测定白假丝酵母菌对药物敏感的浓度区间以及其生长抑制率，并根据该浓度区间将氟康唑溶液配制 1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 μg·mL^{-1} 共 5 个质量浓度梯度。以氟康唑质量浓度为横坐标，生长抑制率为纵坐标绘制标准曲线。

2.3 类细菌素性质研究

2.3.1 排除有机酸干扰 CFS 用 5 mol·L^{-1} NaOH 溶液调至 pH 6.5 后，按“2.2”项下方法测定抑菌活性。

2.3.2 排除过氧化氢干扰 称取 0.05 g 过氧化氢酶溶解于 1 mL pH ＝ 7 的 0.2 mol·L^{-1} 的磷酸盐缓冲液，加入“2.3.1”项下调至中性的 CFS 于磷酸盐缓冲液中，使 CFS 中过氧化氢酶的终质量浓度为 2 mg·mL^{-1}，100 ℃加热使酶失活，按“2.2”项下方法测定抑菌活性。

2.3.3 酶解稳定性 在 8 个 15 mL 离心管中各加入 5 mL CFS，并将 pH 调至每种酶的最适 pH，再分别在 7 个离心管中加入木瓜蛋白酶、脂肪酶、α-淀粉酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶、α- 糜蛋白酶、胃蛋白酶，使酶的终质量浓度为 1 mg·mL^{-1}，37 ℃水浴 2 h，100 ℃加热使酶失活，最后测定抑菌活性。留下一支不加酶处理，作为对照（control）。

2.3.4 温度稳定性 在 8 个 15 mL 离心管中各加入 5 mL CFS（pH 6.5），分别在 40、50、60、70、80、100、121 ℃下加热处理 30 min，留下一支作为空白对照，CFS 调至 pH 6.5 后测定抑菌活性。

2.3.5 pH 稳定性 在 13 个 15 mL 离心管中各加入 5 mL CFS，用 5 mol·L^{-1} NaOH 溶液和 5 mol·L^{-1} 盐酸溶液分别调节 pH 为 1 ～ 12，留下一支作为空白对照，CFS 调至 pH 6.5，测定抑菌活性。

2.4 类细菌素的分离纯化及表征

2.4.1 饱和硫酸铵沉淀 将 600 mL CFS（pH 6.5）置于摇床上，加入硫酸铵粉末，使 CFS 中硫酸铵的饱和度为 50%，继续震荡 30 min，4 ℃静置过夜后

离心，将上清液再次置于摇床上加入硫酸铵粉末，使上清液中硫酸铵的饱和度为 80%，其余操作同上。将离心后得到的沉淀用 6 mL 磷酸盐缓冲液（pH 6.5，浓度为 0.2 mol • L^{-1}）复溶，4 ℃保存备用。

2.4.2 疏水柱层析 吸取 10 mL 辛基 - 琼脂糖凝胶 CL-4B 于层析柱中，用 5 倍柱体积（BV）超纯水洗涤柱子，用 3BV 的 2 mol • L^{-1} NaCl 溶液平衡柱子，将预先加入 NaCl 固体使其终浓度为 2 mol • L^{-1} 的沉淀复溶液过柱，用 1、0.5 mol • L^{-1} NaCl 溶液和超纯水各 30 mL 进行洗脱，用离心管收集 0.5 mol • L^{-1} 时的洗脱液。

2.4.3 透析、冻干 将收集到的具有抑菌活性的洗脱液，装入截留分子量为 500 ～ 1000 的透析袋中，然后将透析袋置于装有 2 L 超纯水的 3 L 烧杯中，用磁力搅拌器低速搅拌，4 ～ 6 h 换一次水，透析 48 h，并用电导率仪测定透析液和超纯水的电导率，两者相同后停止透析，反之继续透析。透析后的液体真空冻干 4 ～ 5 d，得到固体粉末 0.0507 g。

2.4.4 蛋白含量测定 采用 Bradford 法测定蛋白含量，取 6 支试管，配制等梯度浓度的 BSA 溶液，加入考马斯亮蓝溶液后在 595 nm 处测定吸光度值，以浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标绘制标准曲线，计算蛋白浓度。

2.4.5 硫酸 - 苯酚法和双缩脲反应显色

① 硫酸 - 苯酚法：以 50 mmol • L^{-1} 磷酸盐缓冲液为溶剂，配制终质量浓度为 14 mg • mL^{-1} 和 0.5 mg • mL^{-1} 的类细菌素样品液和葡萄糖溶液备用。取三支试管分别加入 1 mL 50 mmol • L^{-1} 磷酸盐缓冲液、样品液和葡萄糖溶液，再分别加入 1 mL 5% 苯酚溶液，立即震荡混匀，迅速加入 4 mL 浓硫酸混匀，静置 20 min，观察显色结果。

② 双缩脲反应：取两个 10 mL EP 管分别加入 1 mL 50 mmol • L^{-1} 磷酸盐缓冲液和样品溶液，再分别加入 1 mL 双缩脲试剂 A 液，立即混匀后加入 100 μL 双缩脲试剂 B 液混匀，静置 20 min，观察显色结果。

2.4.6 紫外光谱及傅里叶红外光谱分析 将冻干样品液稀释 3 倍后用紫外分光光度计测定 190 ～ 400 nm 内紫外吸收光谱。采用溴化钾（KBr）压片法制备样品，在 500 ～ 4000 cm^{-1} 测定样品红外光谱。

2.4.7 高效液相色谱分析 色谱柱：Symmetry C18（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 A：0.1% 三氟乙酸水溶液，流动相 B：0.1% 三氟乙酸乙腈溶液，梯度洗脱（0 ～ 1 min，5%B；1 ～ 5 min，40%B；5 ～ 20 min，60%B；20 ～ 23 min，80%B；23 ～ 25 min，100%B）；流速 1.0 mL • min^{-1}；进样量 20 μL；检测波长 220 nm。

2.4.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE） 对纯化后的类细菌素采用 SDS-PAGE 测定纯度和分子量。类细菌素上样量为 20 μg 和 40 μg，溴酚蓝离玻璃板底部约 1 cm 时终止电泳。考马斯亮蓝染色 3 h 后脱色，用凝胶成像仪显影成像。

2.5 统计学处理

采用 Origin 2021 统计学软件进行分析，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 t 检验比较对照组与实验组的水平，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 效价标准曲线

为了定义标准效价和 CFS 中抑菌物质的效价，选择将氟康唑作为标准药物，扩大药物浓度区间，寻找对白假丝酵母菌抑制作用敏感的区间。结果如图 1A 所示，在氟康唑 1 ～ 2 μg • mL^{-1} 时白假丝酵母菌 600 nm 处的光密度（*OD*）值下降斜率最大，然后随着氟康唑浓度的增大，光密度值下降的斜率逐渐变缓，在氟康唑 3.9 ～ 62.5 μg • mL^{-1} 存在一个平台期；生长抑制率也呈现相同的变化趋势，说明随着药物浓度的升高，抑菌活性变化的不明显，很可能不存在线性关系。因此，将氟康唑的质量浓度定在 1 ～ 2 μg • mL^{-1} 研究氟康唑浓度与生长抑制率的关系。结果如图 1B 所示，氟康唑质量浓度在 0.8 ～ 1.6 μg • mL^{-1} 时，对白假丝酵母菌的生长抑制率呈线性关系，线性方程为 $y = 40.45x - 18.70$，$R^2 = 0.992$。因此，将 1 个单位的效价（U）定义为抑菌物质对白假丝酵母菌的生长抑制率换算成氟康唑浓度后，即每 0.01 μg • mL^{-1} 为 1 U。

3.2 类细菌素性质研究

3.2.1 有机酸和过氧化氢排除 当用 NaOH 和过氧化氢酶处理后，CFS 对白假丝酵母菌的抑制活性从 260.5 U • mL^{-1} 降至 96.0 U • mL^{-1} 左右，但对白假丝酵母菌仍存在一定抑制作用，说明 CFS 中存在具有抑菌活性的类细菌素（见图 2）。

3.2.2 类细菌素热稳定性、酸碱稳定性和蛋白酶敏感性 将 CFS 加热至 40 ～ 121 ℃，考察类细菌素对温度的稳定性。结果见图 3A，在 40 ～ 100 ℃，与对照组相比，类细菌素活性并未显著降低；而在 121 ℃下，活性显著降低，但活性仍保留了 90% 左右，因此说明本研究中卷曲乳杆菌产生的类细菌素具有较高的热稳定性。

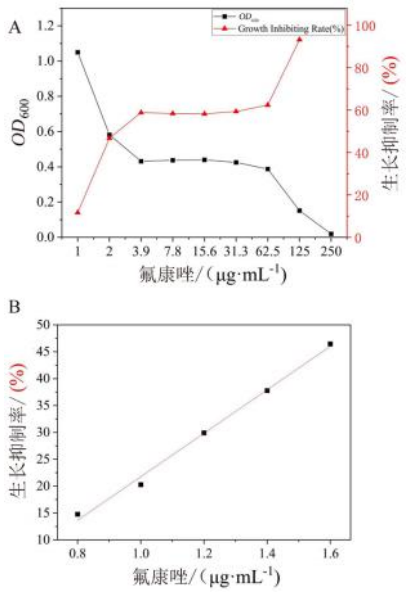


图 1　氟康唑不同浓度对应的生长抑制率标准曲线

Fig 1　Standard curve of growth inhibiting rate corresponding to different fluconazole concentrations

将 CFS 用 5 mol • L^{-1} NaOH 溶液和 5 mol • L^{-1} 盐酸溶液调至不同 pH 下静置 4 h 后观察酸碱环境对卷曲乳杆菌类细菌素抑菌活性的影响。结果见图 3B，在 pH 1 ～ 12 内，类细菌素均具有良好的抑菌活性，各实验组与对照组相比，并无显著性差异。说明在较为极端的酸碱环境下，卷曲乳杆菌类细菌素的结构也未被破坏，具有较高的稳定性，导致依然维持原有的抑菌活性。

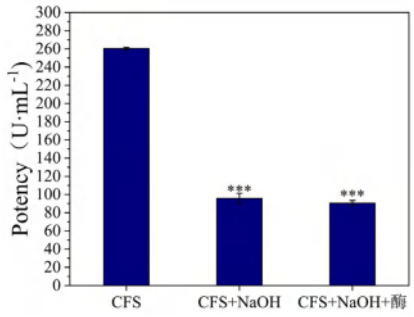


图 2　有机酸和过氧化氢排除实验

Fig 2　Elimination experiments of organic acids and hydrogen peroxide

注：与 CFS 组比较，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the CFS group，$^{***}P < 0.001$.

将 CFS 采用不同的蛋白酶处理后测定抑菌活性，考察类细菌素对蛋白酶的敏感性。结果见图 3C，除脂肪酶外，木瓜蛋白酶、α- 糜蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶和 α- 淀粉酶对类细菌素均具有水解作用。类细菌素经上述酶处理后，其抑菌活性显著降低了 49% ～ 72%。综上结果推测，卷曲乳杆菌类细菌素可能是一种具有蛋白质性质的物质，其经 α- 淀粉酶处理后水解失去 30% 左右的活性，说明卷曲乳杆菌类细菌素可能是一种糖蛋白或糖肽。

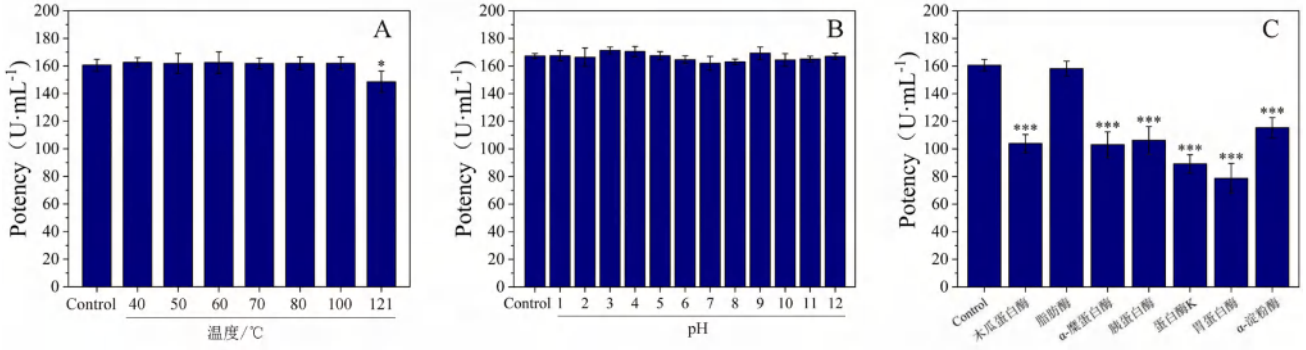


图 3　类细菌素的热稳定性（A）、酸碱稳定性（B）和蛋白酶敏感性（C）

Fig 3　Thermalstability（A），acid-base stability（B），and protease sensitivity（C）of bacteriocin-like substance

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$.

3.3　类细菌素的分离纯化及表征

3.3.1　分离纯化　采用分级沉淀的方式浓缩抑菌物质，先用 50% 饱和硫酸铵沉淀出杂质蛋白，再用 80% 饱和硫酸铵进行沉淀，收集沉淀并用磷酸盐缓冲液复溶，利用辛基 - 琼脂糖凝胶 CL-4B 进一步纯化，再用 1、0.5 mol • L^{-1} NaCl 溶液和超纯水各 30 mL 依次进行洗脱，用离心管收集 0.5 mol • L^{-1} 梯度下的洗脱液。CFS 的比活力为 218.6 U • mg^{-1}，经硫酸铵沉淀后，比活力为 145.5 U • mg^{-1}，得率只有 1.19%；经疏水柱层析后比活力上升到 700.7 U•mg^{-1}，提升了 3.2 倍，产率为 1.74%。结果见表 1。

表 1　类细菌素的分离纯化

Tab 1　Separation and purification of bacteriocin-like substance

纯化方法	体积 / mL	总蛋白 / mg	总活力 / U	CFS 比活力 /（U • mg^{-1}）	得率 / %
CFS	600	239.6	52 380.7	218.6	100
硫酸铵沉淀	6	4.3	626	145.5	1.19
疏水柱层析	5	1.3	911	700.7	1.74

3.3.2 显色反应和紫外光谱、红外光谱表征 利用苯酚 - 硫酸法和双缩脲反应对类细菌素进行显色，同时排除了溶剂（磷酸盐缓冲液）的干扰后，发现类细菌素双缩脲反应显色为紫色（见图 4A），苯酚 - 硫酸法显色为橙红色（见图 4B），说明类细菌素可能是糖肽或糖蛋白。

类细菌素溶液的紫外吸收光谱（见图 4C）在 280 nm 处有一吸收峰，通常含色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香氨基酸的蛋白质会在 280 nm 附近有较大吸收，说明抑菌物质可能是含有少量芳香族氨基酸的蛋白质或多肽。此外，在 220 nm 左右，有很强的吸收，可能是抑菌物质中含有氨基酸导致的，因为有研究表明 17 种氨基酸在 200 ～ 220 nm 均会有吸收峰 [7]。

类细菌素在 500 ～ 4000 cm^{-1} 内的红外吸收光谱如图 4D 所示，在 3442 cm^{-1} 出现较强吸收，刚好落在仲酰胺的主要特征峰（酰胺Ⅱ带，ν_{N-H} 伸缩振动及 δ_{N-H} 弯曲振动）3460 ～ 3420 cm^{-1} 内，且吸收峰较宽，说明是 N-H 键和 O-H 键的伸缩振动叠加，分子间或分子内存在氢键，这也是多糖和蛋白质的特征吸收峰 [8]。2965 cm^{-1} 和 2931 cm^{-1} 是糖类和蛋白质的烷基上 C-H 键的伸缩振动 [9]。1644 cm^{-1} 是酰胺羰基 C ＝ O 伸缩振动的吸收峰，也是酰胺的主要特征峰（酰胺Ⅰ带），1544 cm^{-1} 为 N-H 的弯曲振动 [10]，1401 cm^{-1} 和 1452 cm^{-1} 是 C-H 键的弯曲振动，为蛋白分子肽键上的特征吸收峰，1315 cm^{-1} 是酰胺 C-N 的吸收峰，是酰胺的第三个主要特征峰（酰胺Ⅲ带），吸收较弱。而指纹区 1187 cm^{-1} 和 1117 cm^{-1} 的吸收峰是多糖分子中 C-O-C 伸缩振动吸收峰 [11]。从红外光谱图可以得出，抑菌物质为糖蛋白或糖肽，与蛋白酶敏感性实验结果和显色结果是一致的。

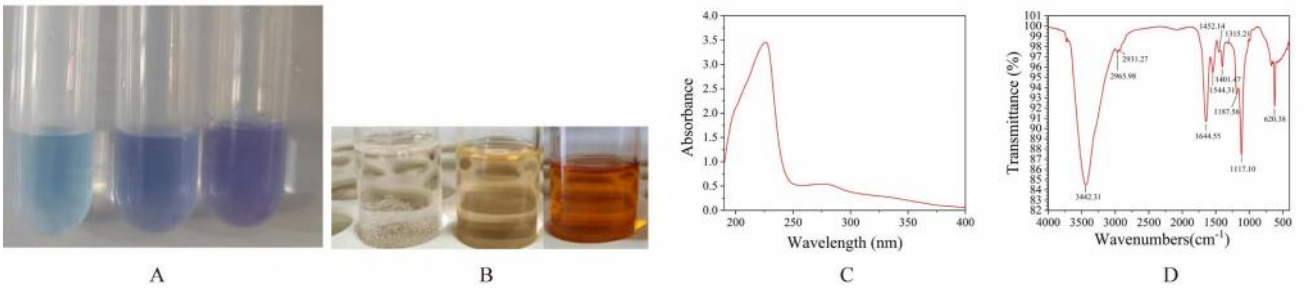


图 4 类细菌素的硫酸 - 苯酚显色反应（A）、双缩脲反应（B）以及紫外吸收光谱（C）和红外吸收光谱图（D）

Fig 4 Sulfuric acid-phenol color reaction（A），biuret reaction（B）and ultraviolet absorption spectra（C）and infrared absorption spectra（D）of bacteriocin-like substance

3.3.3 高效液相色谱检测结果 结果如图 5 所示，流动相 A 液和流动相 B 液的峰形和出峰的保留时间有三组是一致的，分别在 5.94、7.81、8.00 min 左右；与流动相 A 液的谱图相比，流动相 B 液多出了 3.35 min 处的一个峰，判断为溶剂乙腈的峰；与上述三组图谱相比，样品出现了两组新的峰，一组的保留时间约为 7.38 min，另外一组为 7.68 min，且峰面积占比分别为 20.41% 和 75.01%，因此判断这是抑菌物质的峰，同时也可以看出样品是一个混合物，含有两种成分。

3.3.4 SDS-PAGE 测定分子量 类细菌素的分子量经 SDS-PAGE 测定，结果如图 6 所示，条带主要集中在 55 kD 左右，而 HPLC 结果显示，可能是个混合物，说明虽然只有一个条带，但是可能是分子量接近的两种物质。

4 讨论

通过有机酸和过氧化氢排除实验发现，CFS 中含有大量的有机酸，而乳酸、乙酸等有机酸会使得 CFS 的 pH 较低，从而抑制白假丝酵母菌的生长。而加入过氧化氢酶的 CFS，其抑菌效果与中和的 CFS 的抑制率并无显著性差异，说明分泌的过氧化氢较少。通过排除有机酸和过氧化氢的干扰，CFS 仍对白假丝酵母菌有抑制作用，说明存在具有抑菌活性的类细菌素。

对 CFS 中的类细菌素进行热稳定性、酸碱稳定性和蛋白酶敏感性实验，结果表明卷曲乳杆菌类细菌素可能是一种具有蛋白质性质的物质，同时其经 *α*- 淀粉酶处理后水解失去 30% 左右的活性，说明卷曲乳杆菌类细菌素可能是一种糖蛋白或糖肽。CFS 中的类细菌素与 Wang 等 [6] 分离出的 *L. crispatus* 植物乳杆菌产生的 Plantaricin ZJ5[12] 和 Plantaricin SLG1[13] 类似，具有良好的热稳定性。Wayah 等 [14] 分离出的新型细菌素 Salivaricin mmaye1 在 pH 2 ～ 10 内仍具有抑菌活性，说明类细菌素具有良好的酸碱稳定性。此外，在蛋白酶敏感性方面，Kim 等 [15] 将卷曲乳杆菌 ATCC 33820 培养后的上清液、Pei 等 [16]

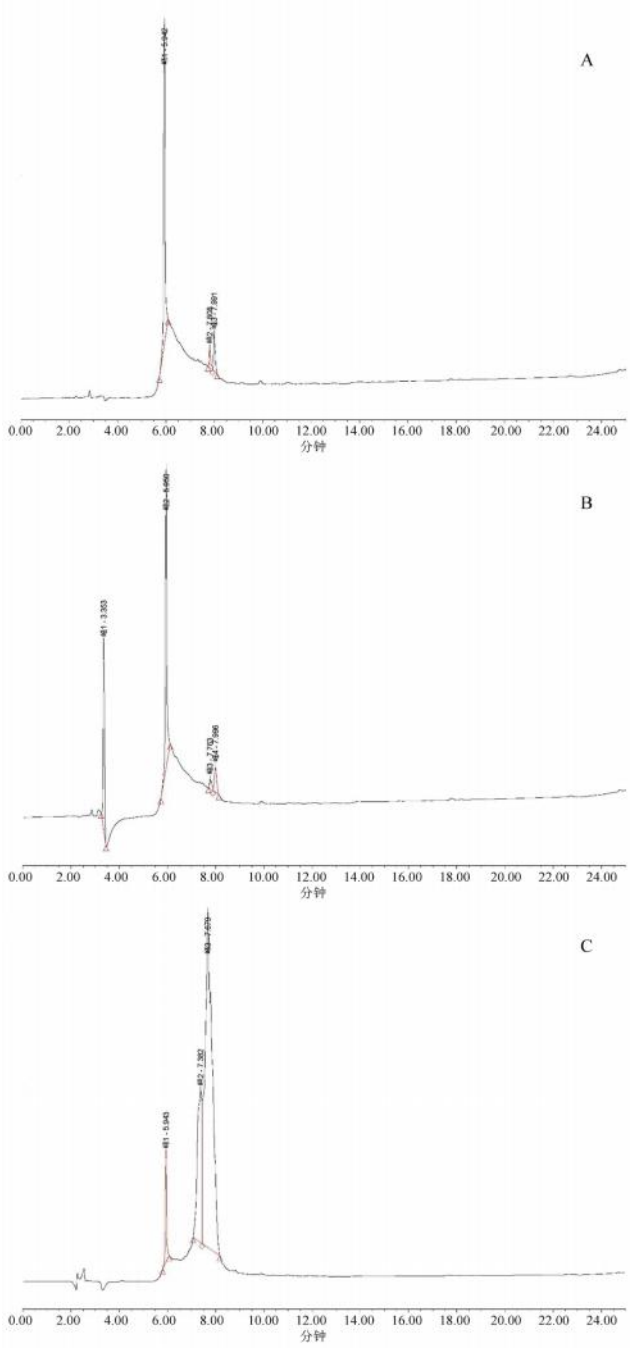


图 5　流动相 A 液（A）、流动相 B 液（B）和样品（C）的 HPLC 谱图

Fig 5　HPLC chromatogram of solution A（A），solution B（B）and sample（C）

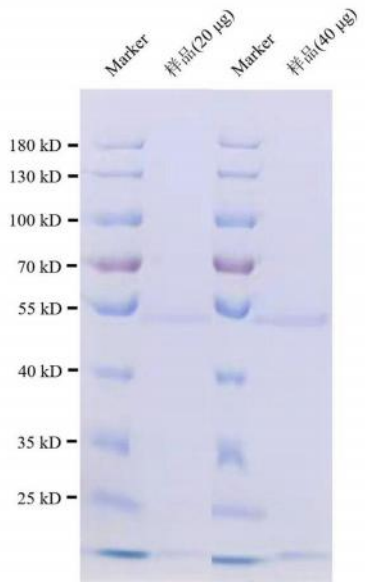


图 6　SDS-PAGE 凝胶电泳测分子量

Fig 6　Molecular weight measurement by SDS-PAGE gel electrophoresis

提取出的新型细菌素 SLG10 和 Saraniya 等 [17] 分离出的细菌素用蛋白酶处理后，检测后发现抑菌活性均有一定程度的降低。

本研究采用硫酸铵沉淀、疏水柱层析及透析等方法分离纯化类细菌素。研究中先用 50% 饱和浓度的硫酸铵沉淀出大部分杂质蛋白，离心后取上清液继续增加硫酸铵饱和浓度至 80%，离心后得到含有类细菌素的沉淀，复溶后进行下一步纯化。实验发现，离子交换柱后液的抑菌活性以及紫外吸收光谱与同比稀释的 CFS 相比，无显著性变化，表明分离效果不如疏水柱层析，因此选择了疏水柱层析。

硫酸 - 苯酚法是一种常用的、简单可靠、迅速灵敏的测定多糖含量的方法 [18-20]。本研究采用硫酸 - 苯酚法进行显色，结果表明样品溶液呈现橙红色，说明抑菌物质中含有糖基成分。样品溶液在双缩脲反应中呈现紫色，说明抑菌物质是蛋白类物质，这与蛋白酶敏感性实验、紫外光谱和红外光谱结果具有一致性。

本研究中采用 SDS-PAGE 凝胶电泳初步确定样品的分子量，条带主要集中在 55 kD 左右，而 HPLC 结果显示，在 7.38 min 和 7.68 min 出现了峰，说明凝胶上虽然只有一个条带，但是可能是分子量接近的两种物质。研究表明，部分乳酸菌可以产生至少一种以上的具有抑菌活性的肽，且分子量很接近 [21-23]。

VVC 具有高发病率、高复发性等特点，常用氟康唑、克霉唑等抗真菌药物进行治疗，但女性阴道是一个动态平衡的微生态系统，定植了占主导地位的乳酸杆菌和机会致病菌，抗真菌药物在杀死致病菌的同时也影响了乳酸杆菌的正常生长，未从根本上恢复阴道微生态平衡，从而增加阴道的易感性，导致 VVC 频繁复发。卷曲乳杆菌是一种阴道内源菌，可以分泌具有抑菌活性的代谢产物抵御致病菌的生长和定植。这种代谢产物理论上可作为重建微生态平衡，减少耐药性产生和降低 VVC 复发率的潜力药物。因此对其进行初步分

离纯化和性质鉴定，可为后续研究奠定基础。

参考文献

[1] Borges S，Silva J，Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health [J]. Arch Gynecol Obstet，2014，289（3）：479-489.

[2] Kalia N，Singh J，Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections：a critical review [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob，2020，19（1）：5-23.

[3] Smith SB，Ravel J. The vaginal microbiota，host defence and reproductive physiology [J]. J Physiol-London，2017，595（2）：451-463.

[4] Matsubara VH，Wang Y，Bandara HMHN，et al. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of Candida albicans biofilm development by reducing their growth，cell adhesion，and filamentation [J]. Appl Microbiol Biotechnol，2016，100（14）：6415-6426.

[5] Ribeiro FC，de Barros PP，Rossoni RD，et al. Lactobacillus rhamnosus inhibits Candida albicans virulence factors in vitro and modulates immune system in Galleria mellonella [J]. J Appl Microbiol，2017，122（1）：201-211.

[6] Wang S，Wang QY，Yang E，et al. Antimicrobial compounds produced by vaginal Lactobacillus crispatus are able to strongly inhibit candida albicans growth，hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions [J]. Front Microbiol，2017，8：564.

[7] 董欣，王丽燕 . 氨基酸紫外光谱的再测定 [J]. 德州学院学报，2015，31（2）：44-46.

[8] Zhang G，Han L，Zhang G，et al. Purification and characterization of a novel glycoprotein from Streptomyces sp ZX01 [J]. Int J Biol Macromol，2015，78：195-201.

[9] Kim EY，Rafiquzzaman SM，Lee JM，et al. Structural features of glycoprotein purified from Saccharina japonica and its effects on the selected probiotic properties of Lactobacillus plantarum in Caco-2 cell [J]. J Appl Phycol，2015，27（2）：965-973.

[10] Wang FX，Wang W，Huang YL，et al. Characterization of a novel polysaccharide purified from a herb of Cynomorium songaricum Rupr [J]. Food Hydrocolloids，2015，47：79-86.

[11] Guo R，Cao NN，Wu Y，et al. Optimized extraction and molecular characterization of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds [J]. Int J Biol Macromol，2016，82：231-242.

[12] Song DF，Zhu MY，Gu Q. Purification and characterization of Plantaricin ZJ5，a new bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum ZJ5 [J]. PLoS One，2014，9（8）：e105549.

[13] Pei JJ，Li XS，Han H，et al. Purification and characterization of plantaricin SLG1，a novel bacteriocin produced by Lb. plantarum isolated from yak cheese [J]. Food Control，2018，84：111-117.

[14] Wayah SB，Philip K. Purification，characterization，mode of action，and enhanced production of Salivaricin mmaye1，a novel bacteriocin from Lactobacillus salivarius SPW1 of human gut origin [J]. Electron J Biotechnol，2018，35：39-56.

[15] Kim JW，Rajagopal SN. Antibacterial activities of Lactobacillus crispatus ATCC 33820 and Lactobacillus gasseri ATCC 33323 [J]. J Microbiol，2001，39（2）：146-148.

[16] Pei JJ，Jin WG，Abd El-Aty AM，et al. Isolation，purification，and structural identification of a new bacteriocin made by Lactobacillus plantarum found in conventional kombucha [J]. Food Control，2020，110：106923.

[17] Saraniya A，Jeevaratnam K. Purification and mode of action of antilisterial bacteriocins produced by Lactobacillus pentosus SJ65 isolated from Uttapam Batter [J]. J Food Biochem，2014，38（6）：612-619.

[18] Chen F，Huang GL. Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng [J]. Int J Biol Macromol，2019，125：906-908.

[19] Zeng CB，Ye GY，Li GC，et al. RID serve as a more appropriate measure than phenol sulfuric acid method for natural water-soluble polysaccharides quantification [J]. Carbohydr Polym，2022，278：118928.

[20] Chen L，Huang GL. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol，2019，126：743-746.

[21] Hayes A，Ross RP，Fitzgerald GF，et al. Casein-derived antimicrobial peptides generated by Lactobacillus acidophilus DPC6026 [J]. Appl Environ Microbiol，2006，72（3）：2260-2264.

[22] Ghalfi H，Benkerroum N，Ongena M，et al. Production of three anti-listerial peptides by Lactobacillus curvatus in MRS broth [J]. Food Res Int，2010，43（1）：33-39.

[23] Garcia-Gutierrez E，O’Connor PM，Colquhoun IJ，et al. Production of multiple bacteriocins，including the novel bacteriocin gassericin M，by Lactobacillus gasseri LM19，a strain isolated from human milk [J]. Appl Microbiol Biotechnol，2020，104（9）：3869-3884.

（收稿日期：2022-10-31；修回日期：2022-12-05）

一种禽类动物关节微透析固定装置的设计和应用研究

任志鑫，李耀磊，杨婷，林志健，王雨，张冰*（北京中医药大学中药学院，北京　102488）

摘要：目的　设计禽类动物关节微透析固定装置，并进行痛风性关节炎鹌鹑模型的微透析采样应用和验证。**方法**　通过对禽类动物生理习性的掌握，创建禽类动物关节微透析固定装置，并通过对实验动物关节液中的尿酸代谢相关指标进行测定和验证。固定鹌鹑使其处于屈膝状态暴露膝关节，将探针埋置关节腔中，探针进口连接推进器，出口插入收集器中，控制透析泵流速为 1 μL·min^{-1}，采用 HPLC 检测方法对透析液中尿酸浓度进行定量分析。**结果**　成功建立固定鹌鹑并暴露膝关节部位的装置结构，可顺利进行微透析采样并检测到稳定的尿酸含量。与 0 d 相比较，鹌鹑模型 10 d、30 d 膝关节液尿酸水平均具有显著差异（$P < 0.01$，$P < 0.001$）。**结论**　禽类动物关节微透析固定装置结构简单、距离调节灵活、适用性强，应用于鹌鹑痛风性关节炎模型时可行性强，可为痛风性关节炎的深入研究奠定基础。

关键词：微透析；关节固定装置；鹌鹑；痛风性关节炎；尿酸
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1751-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.010

Design and application of a microdialysis fixation device in the joints of poultry

REN Zhi-xin, LI Yao-lei, YANG Ting, LIN Zhi-jian, WANG Yu, ZHANG Bing* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing*　102488)

Abstract: Objective　To design the microdialysis fixation device for the joints of poultry, and apply and verify the microdialysis sampling in the quail model of gouty arthritis. **Methods**　By studying the physiological habits of poultry, we designed a microdialysis fixation device for the joints of poultry, measured and verified the related indexes of uric acid metabolism in the joint fluid of quails. The quails were bent to expose the knee joints, and the probe was embedded in the joint cavity. The inlet of the probe was connected with the propeller and the outlet was inserted into the collector. The flow rate of the dialysis pump was controlled set at 1 μL·min^{-1}. The concentration of uric acid in dialysate was quantitatively analyzed by HPLC. **Results**　The device was successfully established to fix the quail and expose the knee joint, so that microdialysis sampling was conducted and content of uric acid determined smoothly. The changes of the uric acid in the knee cavity of the quail model of gouty arthritis were observed dynamically. Compared with d0, the level of uric acid in the knee fluid at d10 and d30 was significantly different ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion**　The microdialysis fixation device for poultry joints has simple structure, flexible adjustment and good applicability, laying a foundation for further study of gouty arthritis.

Key words: microdialysis; joint fixation device; quail; gouty arthritis; uric acid

微透析是一种微创、微量的体内取样技术，用于研究组织中物质的代谢、分布、药理药效。该技术可在不干扰正常实验的前提下进行长时间操作，体内物质通过被透析膜中的透析液连续不断的灌流冲洗带出，具有连续监测的优势，被广泛应用于大脑[1-2]、血液、皮肤、关节等部位的研究，涉及生

基金项目：国家自然科学基金项目（No. U20A20406；No. 82104475）。
作者简介：任志鑫，女，硕士，主要从事中药防治代谢性疾病研究，email：renzx9@163.com　*通信作者：张冰，女，教授，主任医师，博士研究生导师，主要从事中药防治代谢性疾病研究，email：zhangbing6@263.net

物学、神经学、土壤元素含量测定[3]等研究领域，在药学领域研究较为深入。利用微透析技术可以直接检测到血液或组织中的游离药物浓度，操作简单且可实时观察，是研究药代动力学的有效工具。Le Prieult 等[4]采用微透析技术测量清醒和自由活动小鼠体内非靶向结合单抗曲妥珠单抗的间质脑液浓度。Deng 等[5]针对关节炎大鼠的关节腔建立了微透析系统，联合 UHPLC-MS/MS 法测定透析液中的药物与前列腺素 E2 浓度。微透析技术在皮炎、银屑病等皮肤疾病[6]研究也较为广泛，用来评估健康和发炎皮肤的生物过程，更好地理解某些药物在炎症皮肤中的作用机制。

研究结果显示，痛风的患病率为 1.1%[7]，严重威胁人类健康。痛风性关节炎的判定方法以检测到关节液中存在尿酸钠结晶为标准，20 世纪 90 年代 Tsudzuki[9]提出鹌鹑可作为一种新型实验动物用于医学及生物学实验研究，由于其与人类尿酸代谢途径相似，贴近临床痛风性关节炎病理生理的发生发展，常作为痛风病动物模型。目前，鹌鹑的相关实验技术研究较少，且往往要求处死动物，终止实验来获取关节液，导致关节液难以获取、不易操作，且消耗大量实验动物。

禽类动物在关节微透析过程中保持稳定是获取关节液的重要基础。为实现禽类动物的固定，本研究自行设计制作一种禽类动物关节固定装置，可在禽类动物保持清醒、暴露膝关节的同时，稳定收集关节透析液样品。为了验证该装置的有效性、稳定性和可行性，本研究进行了痛风性关节炎鹌鹑模型的膝关节微透析实验。结果表明，自行设计的关节微透析固定装置可以实现鹌鹑保持清醒、稳定固定并暴露膝关节，膝关节液采样稳定，已申请并授权获批国家专利——实用新型专利（ZL202121182858.6），现报道如下。

1 材料

1.1 试药

尿酸对照品（上海源叶，批号：B25666，HPLC ≥ 98%）；乙酸（Fisher，色谱纯）；甲醇（Fisher，色谱纯）；生理盐水、去离子水（Millipore，密理博公司，USA）用前超声至无气泡。

1.2 仪器

① 关节固定装置的制作：亚克力板（PMMA 材质，3 mm 厚，曲阜紫川广告有限公司）、医用胶带（批号：20210801，1.25 cm×910 cm，青岛朵然生物科技有限公司）、纱布（批号：20210601，84 cm×1000 cm，山东鼎特医疗科技有限公司）、绳子等。

② 鹌鹑痛风性关节炎的建立：普通饲料（北京市德岭鹌鹑厂）；酵母浸膏粉（批号：4269054-02，英国 OXOID 公司）；牛骨粉（批号：20210105，衡水爱宠商贸有限公司）；*D*- 果糖（批号：0347C346，美国 AMRESCO 公司）。

③ 鹌鹑微透析探针关节处埋置：CMA20 探针（PAES 微透析膜，透析膜长度 4 mm，轴长度 20 mm，相对分子质量截留 20 000，北京铭泰佳信科技有限公司）；推进器：2.5 mL 玻璃注射器（Hamilton）；透析泵：Pump 11Elite 型微量注射泵（HARVARD APPARTUS）。

④ 高效液相色谱仪：Waters HPLC e2695；色谱柱：Waters symmetry shield RP C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）。

1.3 实验动物

25 日龄迪法克鹌鹑，8 只，雄性，体质量（110±10）g（北京种禽公司德岭鹌鹑厂，动物检疫合格证明编号：No.1101017016）。所有鹌鹑被安置在温度为 20 ～ 25 ℃，相对湿度为 40% ～ 60% 的笼子里。

2 方法

2.1 关节微透析固定装置的制作

目前市场上用于禽类动物的实验固定器比较匮乏，根据禽类动物的生理特性，自主设计制作禽类动物关节固定装置（见图 1）。取适合大小的亚克力板作为底板，在两侧设置 5 个长孔，主体 1 设置为立体三角状，并设有半圆小孔，两侧固定板开设长孔，安装塑料螺纽固定于底板。主体 2 设置为立体“凸”字形，“凸”字形顶端切割两个左大右小的长方形孔，斜板与“凸”字形装置相连，且与地面角度为 60°，分别在“凸”字形顶端的长方形孔下钻有两对小孔，两侧及后侧固定板开设长孔，安装塑料螺纽固定于底板。

2.2 动物造模和微透析探针埋置

根据实验室前期建模基础，建立高嘌呤高钙食饵联合果糖水限水诱导的痛风性关节炎鹌鹑模型，分别于实验 0、10、30 d 时禁食不禁水 12 h，颈静脉取血，3500 r·min^{-1} 离心，分离血清，取上清液备用。

分别于实验 0、10、30 d 随机选取 6 只鹌鹑进行关节透析操作，实验前将鹌鹑用纱布把身体与翅膀包裹在一起，仰卧，将固定装置的主体 1 嵌套在鹌鹑的颈部达到固定鹌鹑的颈部的效果，将鹌鹑双腿从主体 2 穿过，用绳索固定在斜板上，使膝关节屈膝并暴露，剔除膝关节部位的羽毛，

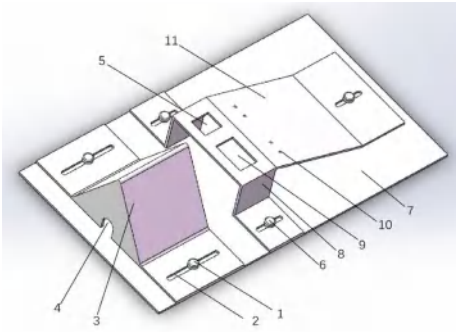


图 1　禽类动物关节固定装置示意图

Fig 1　Scheme of joint fixation device for poultry

1. 塑料螺纽（plastic screw button）；2. 长孔（long-hole）；3. 主体 1（subject 1）；4. 半圆小孔（semicircle hole）；5. 右长方形孔（right rectangular hole）；6. 塑料螺纽（plastic screw button）；7. 底板（base-plate）；8. 主体 2（subject 2）；9. 左长方形孔（left rectangular hole）；10. 小孔（small-hole）；11. 斜板（inclined plate）

镊子夹取碘伏棉球将膝关节处擦拭消毒。在 60 mL 注射器的针头内放置撕裂管，管口与针头出口相平，针头从鹌鹑胫骨最高点与髌骨下缘连线之中点的髌韧带两侧凹陷处斜向下 30° 刺入[10]，感觉到明显的落空感，且无血溢出即可，将针头缓慢拔出，CMA20 探针顺着撕裂管慢慢推进至关节腔，将撕裂管向外拉，使探针的透析膜充分暴露在关节腔内，用医用胶带将探针固定即可。

2.3　鹌鹑透析液尿酸代谢相关指标的测定

分别于实验 0、10、30 d，将关节已植入微透析探针的鹌鹑放置平整，连接进出管路，打开透析泵，以 1 μL • min $^{-1}$ 流速缓慢泵入生理盐水，平衡 20 min。开始正式收集样品后，每 60 min 收集一管样品，更换一次收集管，共收集 120 min，4 ℃保存。样品采集完成后的透析液不需经过任何前处理，可直接注入高效液相色谱仪中进行测定。尿酸对照品溶液的配制：称取 112.3 mg 尿酸对照品溶于 0.02 mol • L $^{-1}$ NaOH 溶液（称取 0.2 g NaOH 定容至 250 mL）定容至 100 mL，4 ℃保存。临用前，用生理盐水稀释成 56.15 μg • mL $^{-1}$ 尿酸对照品溶液，0.45 μm 滤膜过滤。

高效液相色谱条件：流动相为甲醇 -0.5% 乙酸（10∶90），等度洗脱；流速 0.6 mL • min $^{-1}$；30 ℃柱温；检测波长 288 nm；进样量：对照品溶液 5 μL，样品溶液 20 μL，外标法计算膝关节液尿酸含量。

2.4　鹌鹑血清尿酸水测定

对实验 0、10、30 d 的鹌鹑进行颈静脉取血，所得样本室温放置至析出血清后 3500 r • min^{-1} 离心 10 min，分离血清，取血清检测血清尿酸水平。

2.5　统计方法

实验数据用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件进行统计分析，各组数据以平均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间数据比较根据各组正态及方差齐与否采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　鹌鹑关节微透析采样系统的成功搭建

本实验使用自主设计制作的禽类动物关节微透析固定装置，可根据鹌鹑的体形大小任意调节装置距离，且该装置主体 1、2 可独立拆分，满足实验对鹌鹑不同部位研究的需求（见图 2）。

禽类动物关节微透析采样实验时，动物无需麻醉，主体 1、2 分别对鹌鹑的头、腿进行固定，主体 1、2 的容纳腔因空间有限，减少鹌鹑的动作幅度，且防止实验人员误伤到鹌鹑，起到保护作用。探针成功插入鹌鹑膝关节腔内，无血溢出，蓝色管路末端通过管路接头与透析泵上推进器（见图 2A）相连，白色管路末端插入样品收集管（见图 2B），每 60 min 更换一次样品收集管，共收集 120 min，取得鹌鹑膝关节透析液。实验过程中动物呼吸均匀顺畅，头部可自由活动，取样结束后鹌鹑可以立即进食、饮水。装置使用稳定，安全性高，取样简便顺利。

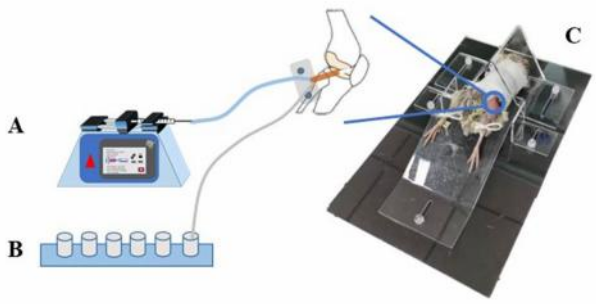


图 2　鹌鹑关节微透析固定装置及探针埋置

Fig 2　Quail joint microdialysis fixation device and probe embedding

A. 透析泵（dialysis pump）；B. 样品收集管（sample collection tube）；C. 关节微透析固定装置（microdialysis fixation device for the joint）

3.2　关节在体微透析测定鹌鹑膝关节透析液的尿酸水平

测得透析液中尿酸结果见表 1。结果显示，与 0 d 相比，在 10、30 d 膝关节液中尿酸水平均显著升高（$P < 0.01$，$P < 0.001$）。提示随着造模时间的延长，膝关节中尿酸的浓度逐渐升高。

3.3　鹌鹑血清尿酸水平变化

结果显示，与实验 0 d 相比，实验 30 d，鹌鹑血清尿酸水平显著升高（$P < 0.001$），见表 2。

表 1 鹌鹑膝关节透析液尿酸水平变化

Tab 1 Uric acid level in knee dialysate of quails

取样时间	膝关节透析液尿酸 /（μg·mL^{-1}）	相对标准偏差 /%
0 d（n = 6）	26.89±7.16	26.6
10 d（n = 6）	48.17±9.82**	20.4
30 d（n = 5）	77.26±7.95***	10.3

注：① 与 0 d 相比，$^{**}P$ < 0.01，$^{***}P$ < 0.001；② 由于造模导致鹌鹑瘦弱情况，30 d 死亡 1 例。

Note：① Compared with 0 d，$^{**}P$ < 0.01，$^{***}P$ < 0.001；② There was one death on the 30th day due to the emaciation of quail caused by modeling.

表 2 鹌鹑血清尿酸水平变化

Tab 2 Serum uric acid level in quail

取样时间	血清尿酸水平 /（μmol·L^{-1}）	相对标准偏差 /%
0 d（n = 8）	263.26±66.15	25.1
10 d（n = 8）	449.20±192.59*	42.9
30 d（n = 7）	854.78±336.64***	39.4

注：① 与 0 d 相比，$^{*}P$ < 0.05，$^{***}P$ < 0.001；② 由于造模导致鹌鹑瘦弱情况，30 d 死亡 1 例。

Note：① Compared with 0 d，$^{*}P$ < 0.05，$^{***}P$ < 0.001；② There was one death on the 30th day due to the emaciation of quail caused by modeling.

4 讨论

痛风性关节炎病理机制的核心环节是血液和关节液中尿酸钠结晶浓度过高，当血尿酸浓度超过 420 μmol·L^{-1} 时，血液中尿酸趋于饱和状态，极易形成尿酸盐结晶沉积于关节腔及其周围结缔组织而引起痛风性关节炎发作。在临床上，部分痛风患者血清尿酸控制在 360 μmol·L^{-1} 以下时，也会存在痛风性关节炎急性发作 [11]。血清尿酸与关节液尿酸之间的关系具有重要意义。2014 年 Wangkaew 等 [12] 发现痛风患者血清尿酸和关节液尿酸比值相较其他类型关节炎显著不同。2018 年 Vaidya 等 [13] 提出在无法使用偏振光显微镜时，采用滑液与血清尿酸比值可以作为痛风的辅助手段。这些研究均显示血清尿酸与关节液尿酸存在差异，而实现关节液尿酸稳定可靠的监测是本装置的制作目标。

4.1 鹌鹑关节微透析采样装置的优势

目前市面上用于禽类动物的实验固定器比较匮乏，无法实现禽类动物稳定、长期的固定，也无法实现屈膝状态，导致关节部位的实验难以进行。而禽类因其体内缺乏尿酸酶，与人类尿酸代谢相似，是制备痛风性关节炎模型的理想型动物 [14-16]。由于麻醉剂量研究尚不明确，一般选择固定装置将实验动物固定进行操作。本研究自主设计的微透析固定装置符合禽类动物生理特性，适用范围是禽类动物，常用的如鹌鹑、鸡、雏鹅等。本研究对鹌鹑进行了膝关节部位的微透析操作，鹌鹑在透析实验过程中固定其颈部和翅身，避免其挣扎，并使其腿部保持屈膝状态，在清醒状态下可顺利采样 120 min，体现微透析“活体”优势，且该装置结构简单、方便操作、实用性较强。本实验设计的固定装置主体 1 边长 10 cm、厚 8 cm，其中主体 1 上的半圆小孔直径 2 cm、下端口 1.5 cm，主体 2 长 10 cm、宽 4 cm、高 5 cm，斜板长 10 cm、宽 12 cm，适用于体质量 110 ～ 200 g 的鹌鹑。如开展肉鸡、雏鹅等动物实验，可将各长度等比例更换为更大尺寸。

4.2 鹌鹑血清尿酸与关节透析液尿酸水平变化的分析

尿酸是痛风性关节炎最重要的危险因素，血清尿酸的高低不能证实或排除痛风，部分高尿酸血症患者不会发展为痛风，而在痛风性关节炎急性发作时，血清尿酸又趋于正常水平。HPLC 对于透析液中尿酸的测定具有简单、可靠、精密度高的优势 [17]。采集到的透析液可以直接用于 HPLC 检测，省略了复杂的前处理过程，提高了实验的准确性，极大地缩短了实验操作时间。本实验中动态监测 0、10、30 d 痛风性关节炎鹌鹑模型的血清尿酸、膝关节液透析液尿酸水平变化，发现随着造模时间的延长，血清及关节液中尿酸均显著升高。提示血液与关节液中尿酸浓度趋势相同，且关节液中尿酸值较血液中偏低，早期有研究发现在无症状高尿酸血症患者以及痛风性关节炎患者发作前后均能检测到关节液中尿酸钠结晶的存在 [18-19]，提示可能是关节液尿酸浓度偏低于血清尿酸浓度的原因。

4.3 微透析采样技术的应用方向

微透析具有活体连续采样、动态实时监测的独到优势，拥有广阔的应用和发展前景。

随着技术逐渐成熟，多位点的微透析被广泛使用 [20]，获得丰富的药代动力学及组织分布信息，定向筛选药物治疗疾病的靶向器官，确定靶器官标志物。Xia 等 [21] 通过对血液和关节双位点微透析发现立方液晶前体能有效减少盐酸青藤碱从大鼠关节腔向血液循环的渗漏，延长盐酸青藤碱在关节腔内的滞留和释放时间。利用微透析技术取样，结合 HPLC 法或液质联用等技术，针对特定的疾病靶点对中药活性成分进行高通量筛选，推断中药小分子与生物体内靶分子间特异性结合程度，同时可以对与靶分子结合的中药成分进行结构表征。PK/PD 模型的建立可以将药物在

机体的药代动力学过程与其对机体的效应关联起来，全面系统地阐释药物的作用机制、药理作用研究及预测药物剂量依赖性的作用时间过程[22]，建立关节部位的 PK/PD 模型，观察药物效应随着时间和质量浓度变化的过程，从血药浓度 - 时间曲线和药理效应 - 时间曲线来预测药物在体内的过程和药效特性，推动药效物质基础和作用机制的深入研究，为疾病治疗和新药研发提供依据。

5 结论

本文自行设计制作禽类动物关节微透析固定装置，构建鹌鹑膝关节透析采样系统，首次应用于鹌鹑痛风性关节炎模型，动态观察鹌鹑痛风性关节炎膝关节腔尿酸水平变化，为痛风性关节炎的药物防治奠定基础。

参考文献

[1] Brandhonneur N，Noury F，Bruyère A，et al. PBPK model of methotrexate in cerebrospinal fluid ventricles using a combined microdialysis and MRI acquisition [J]. Eur J Pharm Biopharm，2016，104：117-130.

[2] Chang HY，Morrow K，Bonacquisti E，et al. Antibody pharmacokinetics in rat brain determined using microdialysis [J]. MAbs，2018，10（6）：843-853.

[3] Connelly CA. Microdialysis update：optimizing the advantages [J]. J Physiol，1999，514（Pt 2）：303.

[4] Le Prieult F，Barini E，Laplanche L，et al. Collecting antibodies and large molecule biomarkers in mouse interstitial brain fluid：a comparison of microdialysis and cerebral open flow microperfusion [J]. MAbs，2021，13（1）：1918819.

[5] Deng R，Wang W，Wu H，et al. A microdialysis in adjuvant arthritic rats for pharmacokinetics pharmacodynamics modeling study of geniposide with determination of drug concentration and efficacy levels in dialysate [J]. Molecules，2018，23（5）：987.

[6] Rea H，Kirby B. A review of cutaneous microdialysis of inflammatory dermatoses [J]. Acta Derm Venereol，2019，99（11）：945-952.

[7] 倪青. 高尿酸血症和痛风病证结合诊疗指南（2021-01-20）[J]. 世界中医药，2021，16（2）：183-189.

[8] Coderre TJ，Wall PD. Ankle joint urate arthritis（AJUA）in rats：an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund’s adjuvant [J]. Pain，1987，28（3）：379-393.

[9] Tsudzuki M. Excalfactoria quail as a new laborarory research animal [J]. Poult Sci，1994，73（6）：763-768.

[10] 邵继征，田瑶，周莉玲. 家兔关节腔中微透析探针植入方法的建立及应用 [J]. 中国比较医学杂志，2013，23（9）：64-67.

[11] Robinson PC，Stamp LK. The management of gout：much has changed [J]. Aust Fam Physician，2016，45（5）：299-302.

[12] Wangkaew S，Kasitanon N，Hongsongkiat S，et al. A comparative study of serum and synovial fluid levels of uric acid between patients with gout and other arthritides [J]. J Med Assoc Thai，2014，97（7）：679-685.

[13] Vaidya B，Bhochhibhoya M，Nakarmi S，et al. Synovial fluid uric acid level aids diagnosis of gout [J]. Biomedical Rep，2018，9（1）：60-64.

[14] 王海鸽，张冰，林志健，等. 高蛋白高钙日粮对鹌鹑尿酸代谢及痛风发生的影响 [J]. 中国家禽，2018，40（19）：22-27.

[15] Hong F，Zheng AJ，Xu PF，et al. High-protein diet induces hyperuricemia in a new animal model for studying human gout [J]. Int J Mol Sci，2020，21（6）：2147.

[16] 朱道仙，吴植，陆江，等. 痛风雏鹅肠道菌群通过 TLR4/MyD88/NF-κB 通路促进肾损伤的研究 [J]. 畜牧兽医学报，2021，52（2）：543-552.

[17] Pleskacova A，Brejcha S，Pacal L，et al. Simultaneous determination of uric acid，xanthine and hypoxanthine in human plasma and serum by HPLC-UV：uric acid metabolism tracking [J]. Chromatographia，2017，80（4）：529-536.

[18] Bomalaski JS，Lluberas G，Schumacher HR，et al. Monosodium urate crystals in the knee joints of patients with asymptomatic nontophaceous gout [J]. Arthritis Rheum，1986，29（12）：1480-1484.

[19] de Miguel E，Puig JG，Castillo C，et al. Diagnosis of gout in patients with asymptomatic hyperuricaemia：a pilot ultrasound study [J]. Ann Rheum Dis，2012，71（1）：157-158.

[20] Mi YH，Guo SY，Cheng H，et al. Pharmacokinetic comparative study of tetramethylpyrazine and ferulic acid and their compatibility with different concentration of gastrodin and gastrodigenin on blood-stasis migraine model by blood-brain microdialysis method [J]. J Pharm Biomed Anal，2020，177：112885.

[21] Xia MQ，Liu L，Tian CL，et al. Pharmacokinetics of sinomenine hydrochloride cubic liquid crystal injection based on microdialysis technology [J]. J Drug Deliv Sci Tec，2019，52：553-558.

[22] van den Brink WJ，Hankemeier T，van der Graaf PH，et al. Bundling arrows：improving translational CNS drug development by integrated PK/PD-metabolomics [J]. Expert Opin Drug Discov，2018，13（6）：539-550.

（收稿日期：2022-10-24；修回日期：2022-12-16）

基于 UPLC-Q-TOF-MS“建昌帮”蜜糠炒苍术炮制前后化学成分分析

朱文婷[1, 2]，陆美霞[1]，丁燕[1]，施林峰[1]，柯杏[1]，叶喜德[1*]，徐倩[3*]（1. 江西中医药大学，南昌 330004；2. 江西中医大学附属医院，南昌 330006；3. 南昌市洪都中医院，南昌 330008）

摘要：目的 运用 UPLC-Q-TOF-MS 法研究建昌帮蜜糠炒苍术炮制前后主成分变化差异。**方法** 采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.2 mm×100 mm，1.7 μm），流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱。在负离子模式下检测，电子喷雾离子源（ESI），扫描范围 *m/z* 100 ～ 1250，结合数据库及相关文献资源，运用 Peak View 1.2 软件对苍术生品和蜜糠炒制品进行化学成分分析。**结果** 从苍术炮制前后共鉴定出 54 种化学成分，其中有机酸类 27 个，萜类 9 个，糖苷类 5 个，聚乙炔类 4 个，黄酮类 1 个，其他类化合物 8 个。苍术生品中鉴定出 27 个独有成分，而蜜糠制品中只鉴定出 4 个独有成分。**结论** 该方法可以系统、准确地鉴定苍术中含有的成分。苍术经炮制后化学种类变化不大，主要含有萜类、有机酸类及聚乙炔类化合物。

关键词：苍术；蜜糠；UPLC-Q-TOF-MS；化学成分
中图分类号：R283，R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1756-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.011

Chemical components of fried Atractylodes Rhizoma with honey bran based on UPLC-Q-TOF-MS before and after the processing

ZHU Wen-ting[1, 2], LU Mei-xia[1], DING Yan[1], SHI Lin-feng[1], KE Xing[1], YE Xi-de[1*], XU Qian[3*] (1. *Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 2. *The Grand Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Nanchang* 330006; 3. *Nanchang Hongdu Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Nanchang* 330008)

Abstract: Objective To determine the difference of principal component changes before and after the processing of “Jianchangbang” honey bran fried Atractylodes Rhizoma by UPLC-Q-TOF-MS method. **Methods** ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (2.2 mm×100 mm, 1.7 μm) was used. The mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) with gradient elution. Detection was in the negative ion mode, with electronic spray ion source (ESI), scanning range of *m/z* 100 ～ 1250, combined with the database and related literature resources, Peak View 1.2 software was used to compare the chemical components of raw Atractylodes Rhizoma and fried honey bran products. **Results** Totally 54 chemical components were identified from Atractylodes Rhizoma before and after the processing, including 27 organic acid, 9 terpenoids, 5 glycosides, 4 polyacetylenes, 1 flavonoid, and 8 other compounds. Totally 27 unique components were identified in raw Atractylodes Rhizoma, 4 unique components were identified in the honey bran products. **Conclusion** The method established can systematically and accurately identify the components in Atractylodes Rhizoma. After the processing, the chemical types of Atractylodes Rhizoma barely change, mainly containing terpenoids, organic acids, and polyacetylene compounds.

Key words: Atractylodes Rhizoma; honey bran; UPLC-Q-TOF-MS; chemical composition

基金项目：江西省中医药科技计划项目（No.2021B652）；江西省中医药中青年骨干人才（第一批）培养计划（赣中医药科教字〔2020〕2号）；江西省中医药科技计划项目重点项目（No.2022Z010）。

作者简介：朱文婷，女，硕士研究生，主管中药师，主要从事中药炮制研究，email：1459523369@qq.com *__通信作者__：叶喜德，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药炮制研究，email：552376722@qq.com；徐倩，女，主管药师，主要从事中药制剂研究，email：10731972@qq.com

苍术 *Atractylodes chinensis*（DC.）Koidz. 为菊科植物苍术的根茎，主产于河北、山西等地，其性温，味辛、苦，主入脾胃、肝经，有健脾燥湿、祛风散寒之功，常用于治疗水肿、泄泻、脘腹胀满、湿浊中焦、风寒感冒等症[1]。苍术主含挥发油，是苍术的有效活性成分，也是燥性的物质基础，大剂量使用苍术生品会抑制中枢神经，导致呼吸麻痹[2-3]。为此，临床常采用适当的炮制方法，以缓和苍术药性，减少其辛燥之性和刺激性[4-5]。目前文献对苍术炮制方法多有记载，但方法各异，如米泔制法，米泔浸后麸炒，醋煮，土炒，还有炒炭法、蒸法、茱萸制、糠炒苍术法等[6]。目前较为常用的炮制品种有麸炒苍术、米泔水制苍术、焦苍术、土苍术以及蒸苍术，2020 年版《中国药典》记载有净制切制法和麸炒法[7]。

江西“建昌帮”为我国南方的一个古药帮，其传统炮制风格是“工具辅料土特，工艺取法烹饪，讲究形色气味，毒性低疗效高”[8]。蜜糠炒苍术为“建昌帮”的特色炮制饮片，与传统的麸炒苍术、制苍术相比，具有独特的优势。蜜糠与生药片拌炒，使生药品均匀受热、添香矫味赋色、缓和药性、增强健脾燥湿功效[9]。目前对于地方特色炮制方法的研究较少，尤其是蜜糠炒苍术的炮制方法尚未见研究报道。超高效液相色谱 - 四极杆串联飞行时间串联质谱（UPLC-Q-TOF-MS）拥有高分离效率、高灵敏度、强分析能力等优点，在中药化学成分定性分析及质量控制方面广泛运用[10]。基于此，本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对蜜糠炒苍术炮制前后主要成分进行定性分析，为苍术炮制作用机制研究奠定基础。

1　材料

1.1　仪器

TripleTOF 5600+ 型高分辨质谱（美国 AB SCIEX 公司），Nexera X2 LC-30A 型超高效液相色谱仪（日本岛津公司），FA 1004 N 型电子天平（0.01 mg，上海精密科学仪器有限公司），YF-1118 型高速中药粉碎机（瑞安市永历制药机械有限公司），TGL-16 B 型高速离心机（上海安亭科学仪器），GB 6003.1-1997 型三号筛（上海新正机械仪器制造有限公司），KQ-500E 型超声仪器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2　试药

纯净水（屈臣氏集团有限公司），甲醇、乙腈均为色谱纯（西陇科学股份有限公司），其他试剂均为分析纯。苍术生品购于安徽亳州药材市场，产地为中国河北，经江西中医药大学刘应蛟副教授鉴定为菊科植物苍术 *Atractylodes chinensis*（DC.）Koidz. 的干燥根茎。

2　方法与结果

2.1　试药的制备

2.1.1　蜜糠的制备　将定量炼蜜和沸水倒入容器内，搅拌溶化，即得蜜水溶液；用文火将净糠炒热后淋入蜜水溶液，迅速拌匀，不断翻炒，炼至糠表皮光亮、色泽稍微加深、微黏手为度，取出摊凉即为蜜炼糠。辅料用量每 100 kg 净糠，用炼蜜 20 kg，用沸水 4 kg。

2.1.2　蜜糠炒苍术　按照《建昌帮中药传统炮制法》[11]，用武火将锅底烧至微红，倒入蜜糠迅速翻炒至冒青烟时，将蜜糠铺平锅底，并向周围铺开；立刻倒入干燥生药片（药材和蜜糠比例为 2∶1），用周围的蜜糠覆盖药材，10 ～ 30 s 后，快速翻炒，至药材表面微黄或黄色时，迅速出锅，筛去蜜糠，晾凉，备用。

2.1.3　供试品的制备　精密称取苍术生品及蜜糠制品粉末（过三号筛）0.5 g，分别各称取 6 份置于 50 mL 具塞锥形瓶中，做好标记，再加入 90% 甲醇 25 mL，摇匀后进行密塞，称定重量，并记录。将样品超声提取 45 min，取出，静置冷却，称定超声后重量并用 90% 甲醇补足失重，摇匀。在高速离心机上 12 000 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，待测。

2.2　检测条件

2.2.1　色谱条件　采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）色谱柱分离，流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 0.01 min，10%B；0.01 ～ 12 min，10% ～ 25%B；12 ～ 18 min，25% ～ 55%B；18 ～ 30 min，55% ～ 70%B；30 ～ 35 min，70% ～ 95%B；35 ～ 37 min，95%B；37 ～ 37.1 min，95% ～ 10%B）；流速 0.3 mL • min^{-1}，进样量 5 μL；柱温 40 ℃。

2.2.2　质谱条件　采用电喷雾离子源（ESI），在负离子模式下采集数据，质量扫描范围：50 ～ 1250 *m/z*。离子源参数：去簇电压 100 ～ 1000 V；喷雾电压 5.54 ～ 5 kV；碰撞能量 10 ～ 10 eV；气帘气压力 40 kPa；离子源温度 500 ℃；雾化气和辅助气压力均为 50 kPa；采集时间为 40 min。

2.3　化学成分鉴定

通过查阅 CNKI、Sci Finder、PubChem、Chem Spider 等数据库资源，建立苍术化学成分质谱信息

表。取供试品按“2.2”项下条件检测，得总离子流图（见图 1）。结果显示，苍术蜜糠炒制前后色谱图差异明显。运用 Peak View 1.2 软件筛查，将所建数据库中目标化合物分子式导入系统中，选择误差在 ±5 ppm（1 ppm ＝ 1×10^{-6}）以内的化合物，并对其二级碎片离子进行匹配，结合分子裂变轨迹、碎片峰、保留时间等信息对苍术生品和蜜糠炒制品等化合物进行分析，共鉴定出 54 个成分，见表 1[12-17]。

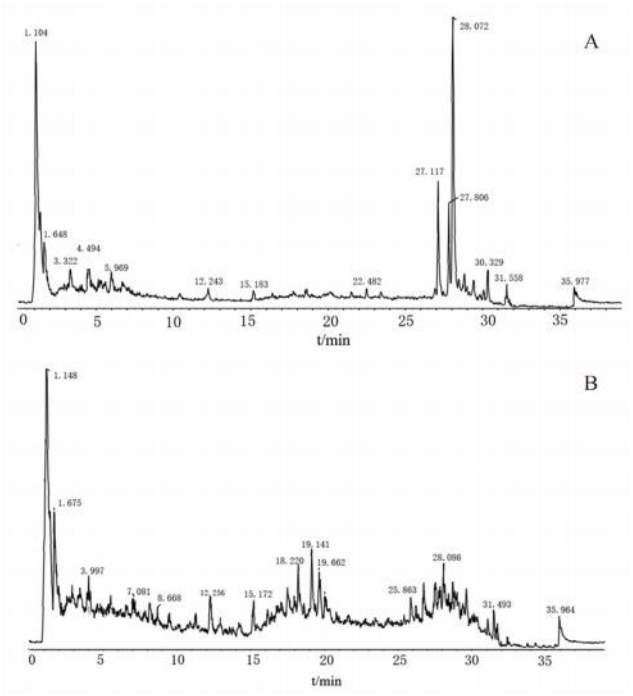


图 1 负离子模式下的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of negative ion modes

A. 苍术生品（raw Atractylodes Rhizoma）；B. 蜜糠炒制品（honey bran fried products）

2.4 化学成分解析

2.4.1 萜类 萜类为苍术的主要成分，包括倍半萜及单萜类。由于倍半萜分子裂解缺乏特征性基团，裂解更具随机性，本研究以化合物 **40** 为例分析其裂解方式。在 ESI^- 模式下出现准分子离子峰 *m/z* 249.1483 $[M-H]^-$，初步推出其分子式为 $C_{15}H_{20}O_3$。其碎片峰主要有 229.8292 $[M-H-H_2O]^-$，201.1736 $[M-H-H_2O-CO]^-$，187.3862 $[M-H-H_2O-C_3H_6]^-$，173.9027 $[M-H-H_2O-C_3H_6-CH_2]^-$，161.7324 $[M-H-H_2O-C_5H_8]^-$，103.9433 $[M-H-H_2O-C_5H_8-CO_2]^-$，89.8341 $[M-H-H_2O-C_5H_8-CO_2]^-$，根据离子峰特征、二级碎片、裂变轨迹，结合对照品信息，并与文献比对[17]，确认该化合物为白术内酯Ⅲ。具体裂解方式见图 2。

2.4.2 有机酸类 在苍术生品和蜜糠炒制品中共鉴定出 27 个有机酸类成分。根据结构类型分为两类：一类是具长碳链并且一端连接羧基的脂肪酸，但易丢失小分子片段如 H_2O 或者 CO_2。另一类是含一分子或两分子咖啡酰氧基的奎宁酸类成分。经高能量轰击，使得酰氧键断裂，故易失去咖啡酰氧基基团或者奎宁酸基团，从而得到特征碎片离子。现以化合物 **13** 为例，在 ESI^- 模式下产生准分子离子峰 *m/z* 353.3475 $[M-H]^-$，可初步鉴定其分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$。分析其二级图谱，主要碎片离子有 *m/z* 191.0357 的奎宁酸负离子、*m/z* 179.9644 的咖啡酸负离子，然后进一步脱去 CO_2 形成具有 *m/z* 135.4546 特征的碎片离子，根据对照品信息，二级碎片、裂变轨迹，参阅文献[13]等，确认此化合物为新绿原酸，具体裂解方式见图 3。

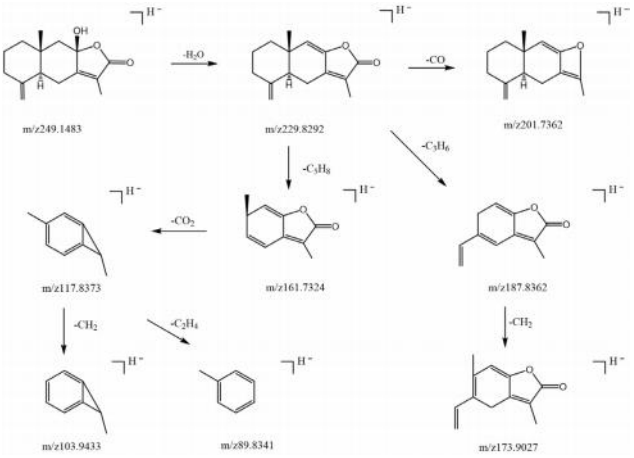


图 2 白术内酯Ⅲ的裂解途径

Fig 2 Fragmentaion pathways of atractylenolide Ⅲ

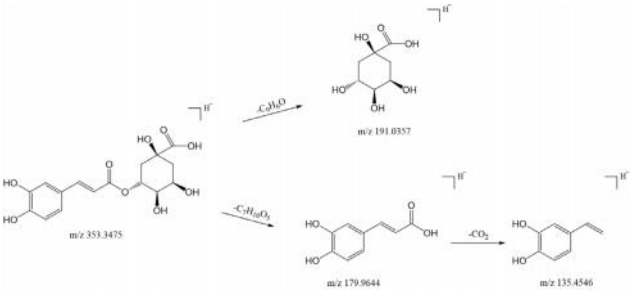


图 3 新绿原酸的裂解途径

Fig 3 Fragmentaion pathway of chlorogenic acid

2.4.3 聚乙炔类 本研究共鉴定出 4 个聚乙炔类化合物，根据其不同母核的化学结构可分为呋喃 - 烯 - 二炔 - 烯共轭结构和烯 - 二炔共轭结构两大类。现以化合物 **26** 为例。在 ESI^- 模式下产生准分子离子峰 309.1357 $[M-Na]^-$，推测出其分子式为 $C_{17}H_{18}O_4$。该化合物具乙酰取代基，故易丢失中性基团 CH_3COOH，从而形成 *m/z* 249.5832 $[M-Na-C_2H_4O_2]^-$ 的碎片离子，延长其分子共轭体系，使其

表 1　苍术生品与蜜糠炒制品中化学成分的鉴定

Tab 1　Identification of chemical components in raw Atractylodes Rhizoma and honey bran fried products

No.	t_R/min	模式	化学式	二级碎片离子峰 m/z	δ/$\times10^{-6}$	化合物名	类别	来源	参考文献
1	1.00	$[M-H]^-$	$C_{14}H_{16}O_2$	201.3676，197.2683，187.2635，143.3685，127.9226，115.6637	3.1	（4*E*，6*E*，12*E*）-tetradeca-triene-8，10-diyne-1，3-diol	d	2	[14]
2	1.12	$[M-H]^-$	$C_7H_{12}O_6$	171.7535，153.0635，125.0542，109.0526，91.0532，83.0784，57.0635	－3.1	奎宁酸	c	1	[14]
3	1.21	$[M-H]^-$	$C_4H_6O_5$	113.8864，87.0534，69.9643，57.0524	1.2	苹果酸	c	1，2	[15]
4	2.49	$[M-H]^-$	$C_9H_{11}NO_2$	148.0452，130.3446，108.9044，68.4486	0.2	*L*-苯丙氨酸	c	1，2	[12]
5	2.61	$[M-H]^-$	$C_6H_6O_3$	107.234，83.1894，79.1035，75.134，69.0433，55.256	2	5-羟甲基-2-呋喃甲醛	a	1，2	[13]
6	2.81	$[M-H]^-$	$C_8H_8O_4$	149.3449，123.8654，109.2248，91.0882，63.3687	－0.4	香草酸	c	1	[13]
7	3.13	$[M-H]^-$	$C_{22}H_{38}O_{12}$	445.9574，427.7526，411.9664，285.0853，247.0743，177.9045，159.0627，57.0145，	－1	（1*R*，4*S*，6*R*）-1，3，3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]oct-6-yl-6-*O*-*β*-*D* glucopyranosyl-*β*-*D*-glucopyranoside	f	1，2	[14]
8	3.33	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{36}O_{10}$	471.4673，203.2564，453.2485，291.1552，319.7894，283.9634，265.07543，247.0637，159.0625，87.0547	－0.4	苍术苷 A	b	1	[15]
9	3.47	$[M-H]^-$	$C_{11}H_{12}N_{22}$	168.2794，158.8436，142.8356，130.6842，116.3078	－3.1	*D*-色氨酸	c	1，2	[12]
10	3.57	$[M-H]^-$	$C_{10}H_8O_4$	177.5692，147.0842，121.0139，103.6941	－3.1	异莨菪亭	f	1，2	[16]
11	3.73	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{28}O_7$	287.0378，247.0586，171.1358，101.8642，73.9563	－3.2	（1*R*，2*R*，4*S*）-2-hydroxy-1，8-cineole-*β*-*D*-glucopyranoside	f	1	[13]
12	4.39	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{18}O_9$	307.9532，293.8463，191.0357，179.9644，159.7379，141.8625，125.0437，109.9867，83.9284，57.9479	－0.8	绿原酸	c	1，2	[13]
13	4.49	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{18}O_9$	353.3475，191.0357，179.9644，135.4546	－0.8	新绿原酸	c	1，2	[13]
14	4.58	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{18}O_9$	332.9875，297.9083，189.9854，177.0864，171.4678，153.9854，133.9485，109.9082，91.9043，57.8031	－0.8	隐绿原酸	c	1，2	[15]
15	4.94	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{26}O_{10}$	363.6482，267.0138，249.9702，237.9054，159.0642，109.8315，69.7824	－0.2	淫羊藿次苷 F2	b	1，2	[15-16]
16	5.94	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{18}O_8$	293.4857，273.6404，189.3484，161.9405，87.9482，59.7854	－2.2	肉桂酰奎宁酸	c	1	[16]
17	6.41	$[M-H]^-$	$C_{19}H_{28}O_{10}$	359.5529，352.5136，345.9716，333.4158，309.5425，291.1865，249.3651，219.3158，189.5178，159.3182，147.3284，129.6473，	0.3	淫羊藿次苷 D1	b	1	[15]
18	6.68	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{36}O_9$	411.3485，385.4548，339.4577，267.4556，249.4855，217.4539，207.2458，159.3647，111.3647，99.3213，69.3423，57.9138	－0.6	（1*S*，4*S*，5*S*，*R*，10*R*）-10，11，14-trihydroxyguai-3-one-11-*O*-*β*-*D* glucopyranoside	a	1	[17]
19	6.91	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{20}O_9$	331.3498，247.6574，189.1738，171.3558，153.3547，133.3578，109.2645，91.6844，	－1.1	3-*O*-阿魏酰奎宁酸	c	1	[16]
20	7.21	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{20}O_9$	325.5645，193.6482，173.9328，155.9822，135.6845，111.0546	－1.1	4-*O*-阿魏酰奎宁酸	c	1	[13]
21	7.49	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{20}O_9$	159.8543，147.8634，133.6438，119.8902，105.3547，81.6984，55.69831	－1.1	5-*O*-阿魏酰奎宁酸	c	1	[14]
22	7.68	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	179.6581，149.1032，135.8021，91.2581，59.3501	－2	阿魏酸	c	1，2	[16]
23	7.88	$[M-H]^-$	$C_9H_6O_3$	145.1846，135.4857，115.4842，87.5469，75.4569，61.8649	－1.4	7-羟基香豆素	f	1，2	[12，14]
24	8.13	$[M-H]^-$	$C_{10}H_8O_4$	193.0482，175.0431，163.9371，159.9351，150.0355，133.7825，122.7024，105.4832	－6.5	莨菪亭	f	2	[13]
25	8.58	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{22}O_3$	257.2456，229.6342，213.4077，201.356，187.2445，173.2954，147.3507，133.0634，67.7343	－2.2	8*β*-甲氧基白术内酯	a	1	[13]
26	10.39	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{18}O_4$	309.1357，249.5832，185.2857，167.0538	－0.9	（1*E*，5*E*，11*E*）-trideca-1，5，11-trien-7，9-diyne-3，4-diyldiacetate	d	1	[15]
27	10.49	$[M-H]^-$	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.4584，335.7268，317.5046，203.6421，191.3725，177.2456，161.3757，135.6756	－0.9	异绿原酸 B	c	1	[15]

续表 1

No.	t_R/min	模式	化学式	二级碎片离子峰 m/z	δ/$\times10^{-6}$	化合物名	类别	来源	参考文献
28	10.68	$[M-H]^-$	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.5784，335.8726，191.7248，179.4248，161.7513，135.8827，227.4645，169.7581	− 0.9	异绿原酸 A	c	1	[13]
29	10.77	$[M-H]^-$	$C_{25}H_{24}O_{12}$	379.2515，313.5429，237.5651，191.9814，179.3578，173.9051，161.3594，135.8423，113.0450	− 0.9	异绿原酸 C	c	1	[13]
30	10.86	$[M-H]^-$	$C_9H_{16}O_4$	169.3487，125.4582，97.3545，57.9281	− 3.4	壬二酸	c	1，2	[13]
31	12.64	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{19}NO$	216.1305，202.1239，186.0947，174.0910，160.0751，144.0851，124.0770，106.0716	− 0.4	白术内酰胺	a	1，2	[17]
32	17.62	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{20}O_4$	153.7545，139.4548，115.4687，109.8751，103.4657	− 1.5	二乙酰苍术素醇	a	1	[13]
33	17.83	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{46}O_{13}$	513.9018，415.6847，399.4136，381.5795，191.0561，161.3184，101.4389，89.2459，71.6842	0.8	苍术苷 G	b	1	[12]
34	18.86	$[M-H]^-$	$C_{10}H_8O_3$	147.5266，143.4961，131.4526	− 1.4	羟甲香豆素	a	1	[15]
35	19.34	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{10}O_5$	271.6356，251.8363，223.7821，195.7532，167.8336，139.0364	− 2.6	黄芩素	e	1	[13]
36	19.84	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{20}O_4$	247.1354，235.1812，219.1828，201.5842，186.4761，161.1833，125.2384，87.0523，57.2684	− 2.4	naphthol[1，2-b]furan-2-one	f	1	[12]
37	20.14	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{34}O_5$	311.2654，293.4831，244.1335，229.4751，211.4829，171.1567，139.4058，121.4861，99.2481，71.3547	− 1.9	三棱酸	c	1，2	[13]
38	22.17	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{22}O_4$	259.8419，241.0432，217.0724，199.5031，171.6031，143.9645，115.063	− 2.2	（6*E*，12*E*）-tetradecadiene-8，10-diyne-1，3-diol-diacetate	d	1	[15-16]
39	22.80	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{12}O_3$	269.2456，243.4685，227.8408，183.669，109.7442	− 1.5	乙酰苍术素醇	a	1	[13]
40	23.23	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{20}O_3$	249.1483，229.8292，201.1736，187.3862，173.9027，161.7324，103.9433，89.8341	− 1.7	白术内酯Ⅲ	a	1，2	[17]
41	24.23	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{20}O_2$	229.8292，211.1763，187.4766，173.2643，161.1805，147.3595，121.1323，103.2645	− 1.7	白术内酯Ⅱ	a	1，2	[13]
42	25.03	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{20}O_4$	281.6038，257.3457，241.8544，211.5803，197.9643，179.1065，171.2486，131.9352，117.0635	− 2	（4*E*，6*E*，12*E*）-tetradecatriene-8，10-diyne-1，3-diol-diacetate	d	1	[12-13]
43	27.30	$[M-H]^-$	$C_{32}H_{54}O_{17}$	665.2648，575.3618，547.3515，415.2941，293.9514，233.5416，221.5971，191.6541，149.5548，119.3259，101.5684，89.3617，71.6511，59.5486	0.8	苍术苷 H	b	1	[12]
44	28.84	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{32}O_3$	277.2173，259.1531，233.7586，195.6815，171.5532，153.7861，141.3848，123.4529，113.5844，59.4256	− 3.2	9，10-环氧-12（*Z*）-十八碳烯酸	c	1，2	[13]
45	29.01	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{24}O_2$	217.6129，197.1879，147.9328，121.1492，95.1474，53.4917	− 4.8	eudesm-4（15），7-diene-9α，11-diol	f	1	[12]
46	29.41	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{30}O_3$	275.4846，249.8246，197.5783，185.4834，149.8468	− 2.1	（9*Z*，11*E*，15*Z*）-13-羟基-9，11，15-十八碳三烯酸	c	2	[12]
47	29.43	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{30}O_3$	275.6911，258.4139，249.6971，237.4196，221.1542，195.4055，179.4852，167.5542，155.5842，113.4521，57.9846	− 1.8	羟基-9，11，15-十八碳三烯酸	c	1，2	[12，15]
48	29.88	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{22}O_2$	173.4268，157.8021，131.8522，121.5831，109.1837，79.1831，57.1802	− 4.8	eudesm-4（15），7-diene-11-ol-9-one	f	1	[12]
49	31.73	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{48}O_3$	413.4865，284.3115，271.1525，103.9415	− 0.7	齐墩果酸	c	1	[15]
50	31.75	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{32}O_2$	261.5823，205.4156，183.4531，59.4736	− 2.8	十八碳-9，12-二烯酸	c	1，2	[12]
51	32.04	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{32}O_2$	253.8412，235.5941，221.4832，215.4834，197.7264，161.4731，145.1433，135.7821，71.2641	− 4.1	十六碳烯酸	c	1，2	[12-13]
52	32.40	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{32}O_2$	227.4821，213.4531，237.3589，219.4122，203.1531，134.482，117.1627，59.0152	− 3	棕榈酸	c	1，2	[12-13]
53	32.54	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{30}O_2$	263.4876	− 2.7	亚麻酸	c	2	[14]
54	32.84	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{34}O_2$	265.2771，235.4822，193.4126，179.4266，161.7521，143.4169，125.4585，87.3518	− 2.7	十八碳-9-烯酸	c	1，2	[13]

注（Note）：a. 萜类（terpenoids）；b. 糖苷类（glycosides）；c. 有机酸类（organic acids）；d. 聚乙炔类（polyacetylene）；e. 黄酮类（flavonoids）；f. 其他（others）；1. 苍术生品（raw Atractylodes Rhizoma）；2. 蜜糠制品（honey bran fried products）。

结构更加稳定。再脱去 C_2HONa，生成烯醇碎片离子，即 *m/z* 185.2857 $[M\text{-}Na\text{-}C_2H_4O_2\text{-}C_2HONa]^-$。由于烯醇结构具不稳定，易丢失一分子 H_2O，而产生相对稳定的 *m/z* 167.0538 $[M\text{-}Na\text{-}C_2H_4O_2\text{-}C_2HONa\text{-}H_2O]^-$的碎片离子。结合碎片离子、裂变轨迹、保留时间等信息，并与文献比对[15]，鉴定出此化合物为（1*E*，5*E*，11*E*）-trideca-1，5，11-trien-7，9-diyne-3，4-diyl diacetate，具体裂解方式见图 4。

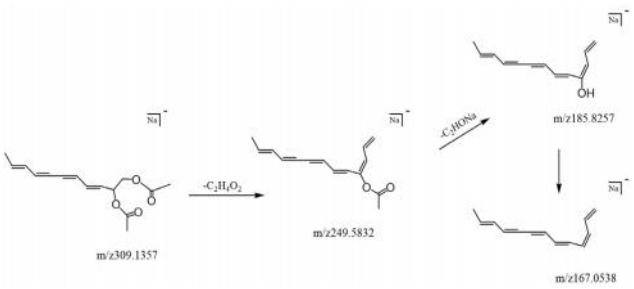


图 4　（1*E*，5*E*，11*E*）-trideca-1，5，11-trien-7，9-diyne-3，4-diyl-diacetate 的裂解途径

Fig 4　Fragmentaion pathways of（1*E*，5*E*，11*E*）-trideca-1，5，11-trien-7，9-diyne-3，4-diyldiacetate

2.4.4　黄酮类　本研究鉴定出 1 个黄酮类化合物，即为黄酮苷元。该化合物在 C 环上变发生 RDA 裂解，且易丢失 H_2O、CO 等中性分子。以化合物 **35** 为例，在 ESI^-模式下产生准分子离子峰 *m/z* 271.6356 $[M\text{-}H]^-$，初步推测分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$。而中性分子丢失后产生的碎片离子为 251.8363 $[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$，223.7821 $[M\text{-}H\text{-}H_2O\text{-}CO]^-$，195.7532 $[M\text{-}H\text{-}H_2O\text{-}CO\text{-}CO]^-$。而发生 RDA 裂解的 C 环则产生 *m/z* 167.8336 碎片离子，再失去一分子 CO 后得 *m/z* 139.0364 碎片离子，结合碎片离子、裂变轨迹、保留时间等信息，并与文献对比[13]，确认此化合物为黄芩素，具体裂解方式见图 5。

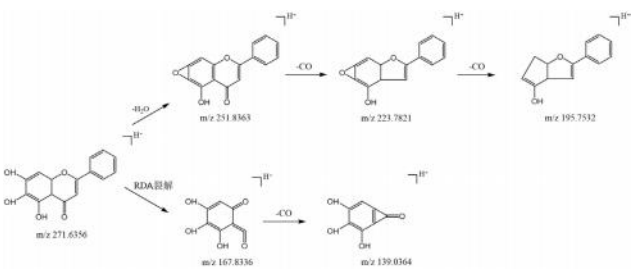


图 5　黄芩素的裂解途径

Fig 5　Fragmentaion pathways of baicalein

2.4.5　糖苷类　苍术中鉴定出 5 个糖苷类成分，其裂解方式大多数是丢失一分子 H_2O，然后脱去葡糖基（Glc）。例如化合物 **8**，在 ESI^-模式下产生准分子离子峰 *m/z* 471.4673 $[M\text{-}Na]^-$，可初步推出其分子式为 $C_{21}H_{36}O_{10}$。其裂解方式分为两种情况，一种是直接脱去一分子葡糖基，得到碎片离子 *m/z* 203.2564；另一种情况是先丢失一分子 H_2O 后得 *m/z* 453.2485 的碎片离子，然后再脱去一分子葡糖基，最后得 *m/z* 291.1552 碎片离子。结合碎片离子、裂变轨迹等信息，并与文献对比[15]，鉴定此化合物为苍术苷 A，具体裂解方式见图 6。

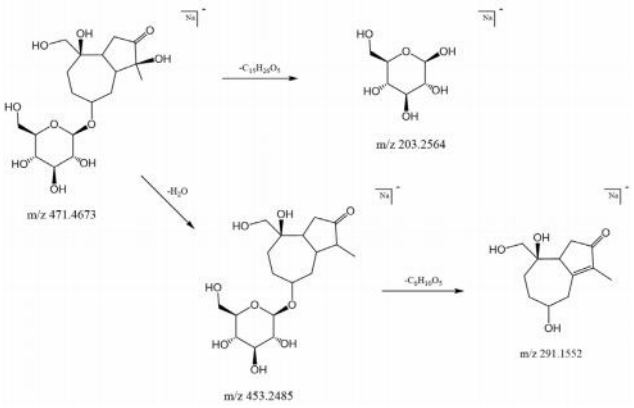


图 6　苍术苷 A 裂解途径

Fig 6　Fragmentaion pathways of atractyloside A

2.4.6　其他类　苍术中鉴定出其他类化合物 8 个，如芳香类、苯丙素类及甾体类等。以化合物 **24** 为例，在 ESI^-模式下产生准分子离子峰 *m/z* 193.0482 $[M\text{-}H]^-$，初步推测分子式为 $C_{10}H_8O_4$。其二级图谱中，可见主要碎片离子峰有 175.0431 $[M\text{-}H\text{-}CH_3]^-$，163.9371 $[M\text{-}H\text{-}CO]^-$，150.0355 $[M\text{-}H\text{-}CH_3\text{-}CO]^-$，159.9351 $[M\text{-}H\text{-}CH_3OH]^-$，133.7825 $[M\text{-}H\text{-}CH_3OH\text{-}CO]^-$，122.7024 $[M\text{-}H\text{-}CO\text{-}CH_3\text{-}CO]^-$，105.4832 $[M\text{-}H\text{-}CH_3OH\text{-}CO\text{-}CO]^-$。结合碎片离子、裂变轨迹等信息，并与文献对比[13]，鉴定此化合物为莨菪亭，具体裂解方式见图 7。

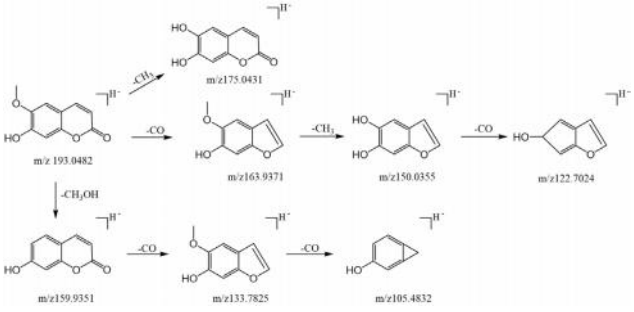


图 7　莨菪亭的裂解途径

Fig 7　Fragmentaion pathways of chrysatropic acid

3　讨论

本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS 法对蜜糠炒苍术炮制前后主成分进行分析，以探讨蜜糠炒对苍术主成分变化的影响。为了优选最佳分析条件，前期分别采用了正离子和负离子模式对苍术醇提物进行了分析。结果发现，在负离子模式下的化

学成分图谱峰数量更多，峰形较正离子模式好，分离度更强，故本研究选择负离子模式作为分析条件。在此条件下，对苍术生品和蜜糠炒制品进行序列测定，分析成分变化出现的特征峰，结合碎片离子、裂变轨迹、保留时间、对照品信息以及文献资料，共鉴定出 54 个化合物，其中有机酸类 27 个、萜类 9 个、糖苷类 5 个、聚乙炔类 4 个、黄酮类 1 个、其他类化合物 8 个。在苍术生品中鉴定出 27 个独有成分，蜜糠炒制品中鉴定出 4 个独有成分。炔烃类、倍半萜类均为苍术主要有效活性成分。如苍术素具抗炎、利尿、抗氧化、保肝等作用[17-18]；β-桉叶醇具抗肿瘤、抗胃溃疡、抑制血管增生、抗肝毒等作用[19]；苍术酮具保肝、抗病毒、抗炎、抑制幻觉等作用[20]；白术内酯Ⅲ具抗衰老、保护心肌、抗胃溃疡、抗氧化等作用[21]。通过分析炮制对苍术主成分变化的影响，并结合这些成分所呈现的药理作用，说明不同炮制方法可通过影响药材成分进而影响其药效。本研究分析蜜糠炒苍术发生的成分变化，并通过鉴定，明确其分子结构及其变化规律，但这些炮制变化后的主要成分是否与药效增强有关，以及何种炮制变化成分关系最为密切等问题，仍需通过药效实验来验证。另一方面，蜜糠为“建昌帮”特色炮制辅料，苍术经蜜糠炒后，由于蜜糠和加热等环节，可能是影响药材成分变化的关键，但其变化原因仍有待研究。本研究可为后续开展蜜糠炒苍术炮制机制研究提供数据支撑。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：168-169.

[2] 王蝉，赵文燕，向茜，等 . 苍术炮制的现代研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（8）：84-88.

[3] 于欢，刘德文，龚鹏飞，等 . 苍术炮制方法及其饮片的质量控制、药效评价研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（23）：194-200.

[4] 方晶，翁丽丽，王美怡，等 . 北苍术米泔水炮制前后化学成分变化及其对脾虚泄泻大鼠肠道真菌菌群的影响 [J]. 中草药，2022，53（23）：7372-7383.

[5] 刘育含，刘玉强，戚晓杰，等 . 基于液质联用技术的苍术炮制前后苍术苷 A 的尿排泄动力学研究 [J]. 药物分析杂志，2018，38（11）：1945-1951.

[6] 钟赣生 . 中药学 [M]. 3 版 . 北京：中国中医药出版社，2012：7.

[7] 石佳琪，吴松南，张强，等 . 苍术炮制历史沿革研究 [J]. 药学研究，2021，40（10）：660-663.

[8] 郭三保，何芹，周铁文，等 . 建昌帮发展历程及炮制特色探究 [J]. 中国中医药现代远程教育，2021，19（6）：80-82.

[9] 邓怡芳，祝婧，钟凌云，等 . 建昌帮特色辅料蜜糠的应用现状及研究进展 [J]. 江西中医药大学学报，2021，33（6）：116-119.

[10] Liu Z，Li N，Li Z，et al. Study on quality markers of Poria cocos Basedon UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology technology [J]. Medicinal Plant，2023，14（1）：12-18.

[11] 上官贤 . 建昌帮中药炮制全书 [M]. 江西：江西教育出版社，2013.

[12] 邓爱平，李颖，吴志涛，等 . 苍术化学成分和药理的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2016，41（21）：3904-3913.

[13] Xue QX，Zhou ZJ，Yin X，et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of atractylodes chinensis [A]//2020 2nd International Conference on Medical Sciences and Biological Engineering [C]. 2020，16（23）：164-173.

[14] Lu JJ，Hu XW，Li P，et al. Global identification of chemical constituent sand rat metabolites of Si-MiaoWan by liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole time-of-flightmass spectrometry [J]. Chin J Nat Med，2017，15（7）：550-560.

[15] 王蝉，向茜，赵文燕，等 . 米泔水漂苍术炮制前后化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（23）：164-173.

[16] 周洁，汤维维，陈君 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法的茅苍术与苍术化学成分分析 [J]. 药学与临床研究，2020，28（5）：321-328.

[17] 谭小燕，易东阳 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的渝东北地产“平术”化学分型研究 [J]. 中药材，2019，42（7）：1560-1565.

[18] 刘国生，孙备，明亮 . 苍术挥发油与水溶性成分的主要药理作用比较 [J]. 安徽医科大学学报，2003，38（2）：124-126.

[19] Ma EL，Li YC，Tsuneki H，et al. Beta-eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation and tumour cell proliferation [J]. J Asia Nat Prod Res，2008，10（1-2）：159-167.

[20] Han NR，Moon PD，Nam SY，et al. Inhibitory effects of atractylone on mast cell-mediated allergic reactions [J]. Chem Biol Interact，2016，258：59-68.

[21] 任燕，黄明进，蒋雯文，等 . 白术内酯Ⅲ通过调节自噬水平清除过氧化物减轻小鼠溃疡性结肠炎 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2022，24（8）：3219-3225.

（收稿日期：2023-02-26；修回日期：2023-05-09）

PD-1/PD-L1/C5ar1 基因人源化小鼠模型的构建及其在免疫治疗中的应用

井红艳[1, 2, 3]，聂琰晖[3]，于兴艳[1, 2, 3]，谢秀龙[1, 2, 3]，杨毅[1, 2, 3*]（1.江西中医药大学药学院，南昌 330004；2.长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；3.百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司，北京　102609）

摘要：目的　构建一种验证 C5AR1 靶点抑制剂或与免疫检查点抑制剂联用治疗肿瘤的药效及毒性的人源化小鼠模型，以加快人 C5AR1 靶点药的开发。**方法**　首先通过基因编辑技术构建 PD-1/PD-L1/C5AR1 人源化（hPD-1/hPD-L1/hC5AR1）小鼠模型。接下来，分析 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠人源化基因的表达及人源化对免疫系统的影响。最后基于 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠建立肿瘤模型来评价抗人 C5AR1 抗体的药效。**结果**　在 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠中只检测到人源 PD-1、PD-L1、C5AR1 蛋白，且各免疫细胞比例与野生鼠相比无明显差异。在小鼠肿瘤模型中发现，与单药相比，联合使用抗人 PD-1 抗体和抗人 C5AR1 抗体能更有效地抑制肿瘤的生长。**结论**　hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠模型可以用于抗人 C5AR1 抗体和抗人 PD-1 抗体的临床前药效验证研究。

关键词：C5AR1；程序性死亡受体 -1；人源化小鼠模型；抗体；免疫治疗
中图分类号：R730.51　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1763-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.012

Construction of *PD-1/PD-L1/C5ar1* gene humanized mouse model and its application in immunotherapy

JING Hong-yan[1, 2, 3], NIE Yan-hui[3], YU Xing-yan[1, 2, 3], XIE Xiu-long[1, 2, 3], YANG Yi[1, 2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang*　330004; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong*　*Jiangsu*　226133; 3. *Biocytogen Pharmaceuticals* (*Beijing*) *Co*., *Ltd*., *Beijing*　102609)

Abstract: Objective　To construct a humanized mouse model that to validate the efficacy and toxicity of human C5AR1-targeted single agents or in combination with anti-human antibodies to the immune checkpoint PD-1/PD-L1 pathway for tumors based on gene editing technology to accelerate the development of human C5AR1-targeted drugs. **Methods**　A PD-1/PD-L1/C5AR1 humanized (hPD-1/hPD-L1/hC5AR1) mouse model was firstly constructed by gene editing technology. Next, the expression of humanized genes and the effect of humanization on the immune system were analyzed in hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 mice. Finally, a tumor model based on hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 mice was established to evaluate the efficacy of anti-human C5AR1 antibody. **Results**　Only human PD-1, PD-L1 and C5AR1 proteins were detected in hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 mice and the poportion of each immune cell was not significantly different from that of wild mice. In the mouse tumor models, the combination of anti-human PD-1 antibody and anti-human C5AR1 antibody was more effective in inhibiting tumor growth compared to single agents. **Conclusion**　The hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 mouse model can be used as a preclinical efficacy validation model for drugs targeting human C5AR1 and PD-1 antibodies.

Key words: C5AR1; PD-1; humanized mouse model; antibody; immunotherapy

基金项目：山东省抗体药物创新创业共同体重大科技项目（No.2021CXCYGTT16）。

作者简介：井红艳，女，硕士研究生，主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究，email：jinghongyan111@163.com　*通信作者：杨毅，男，博士，主要从事免疫学方面的研究，email：benny.yang@bbctg.com.cn

免疫检查点是指表达在免疫细胞上的一系列分子，能够调节免疫激活程度，防止免疫系统过度激活[1]。免疫检查点可以启动抑制 T 细胞功能的信号通路，而免疫检查点抑制剂可以抑制这种肿瘤介导的 T 细胞功能抑制[2]。美国食品药品监督管理局（FDA）已批准数种免疫检查点抑制剂用于多种癌症，包括细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4（CTLA-4）、程序性死亡受体 -1（PD-1）和程序性死亡受体配体 -1（PD-L1）。然而，当单独使用这些免疫检查点抑制剂时，只有约 20% 的实体瘤患者达到缓解[3]，60% 的患者具有耐药性[4]，整体的治疗效果并不理想。

C5AR1 是补体激活片段 C5a 的受体，可募集髓源免疫抑制细胞（MDSCs）形成免疫抑制微环境或调节不同信号通路促进肿瘤生长[5-9]。阻断 C5AR1 已成为治疗肿瘤的新策略。目前，以 C5AR1 为靶点的药物正在研发中，主要的抗人 C5AR1 抗体药有 Avdoralimab 和 TJ210。

C5AR1 抑制剂在机制上与免疫检查点抑制剂互补，联合应用免疫检查点抑制剂和 C5AR1 靶点抑制剂可增强细胞毒性 T 细胞活性，抑制免疫抑制细胞（如 MDSCs）的活性，降低免疫耐受，提高肿瘤治疗效果。在小鼠肺癌模型和结肠癌模型的体内实验中，与单药相比，联合使用 C5AR1 靶点抑制剂和抗人 PD-1 抗体，均显示出更好的抑制肿瘤生长的效果[10-11]。

然而，目前尚无有效的人源化小鼠模型用于同时验证抗人 C5AR1 抗体和抗人 PD-1 抗体的药效及毒性。为满足药物开发中的这种急切需求，本研究拟建立一种可用于临床前验证人 C5AR1 靶点抑制剂或与免疫检查点抑制剂联用药效及毒性的人源化小鼠模型，以加快 C5AR1 靶向药的开发。

1 材料

1.1 实验动物

野生型小鼠（C57BL/6，北京维通利华实验动物科技有限公司，动物合格证号：11036021110055915）和 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠（百奥赛图江苏基因生物技术有限公司，动物合格证号：202145277）均为雌性，5 ～ 8 周龄。所有动物研究均按照动物护理和使用委员会批准的方案进行。动物被饲养在温度（20 ～ 24 ℃）、12 h/12 h 明 / 暗交替的 SPF 级屏障设施中，并可自由获得食物和水。实验结束后采用 CO_2 吸入法处死小鼠。

1.2 试药与仪器

PerCP/Cy5.5 标记的抗鼠的 TCRβ 抗体（批号：109228）、Brilliant Violet 605 标记的抗鼠的 CD19 抗体（批号：115540）、Brilliant Violet 510 标记的抗鼠的 CD45 抗体（批号：103138）、藻红蛋白（PE）标记的抗鼠的 CD279（PD-1）抗体（批号：109104）、PE 标记的抗人的 CD274（B7-H1，PD-L1）抗体（批号：329706）、藻蓝蛋白（APC）标记的抗鼠的 CD274 抗体（B7-H1，PD-L1）(批号：124312)、PE 标记的抗人的 CD88（C5AR1）抗体（批号：344304）、APC 标记的抗鼠的 CD88（C5AR1）抗体（批号：135808）、纯化的抗鼠的 CD16/32 抗体（批号：101302）(Biolegend)。APC 标记的抗人的 CD279（PD-1）抗体（批号：558694）(BD Pharmingen)。Avdoralimab、Pembrolizumab 和人免疫球蛋白 G（hIgG4）对照抗体 [百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司]。Atune NxT 流式细胞仪（ThermoFisher Scientific，USA）。

2 方法

2.1 PD-L1 人源化细胞系与 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠的构建

MC38 细胞（小鼠结肠癌细胞系）在含 1% 青霉素 - 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养[12]。利用 TransIntro 转染试剂将含人 PD-L1 编码序列的载体转染到 MC38 细胞，建立人 PD-L1 蛋白过表达的小鼠 MC38 肿瘤细胞系（hPD-L1 MC38），随后在含 1% 青霉素 - 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 中连续培养，每 3 ～ 5 d 传代 1 次。使用 APC 标记的抗人 PD-L1 抗体通过流式细胞术检测人 PD-L1 蛋白的表达[13]。

在 C57BL/6 遗传背景上，通过 CRISPR/Cas9 技术，将 *PD-1* 基因 IgV 结构域的 2 号外显子全部替换为编码人 *PD-1* 基因 IgV 结构域的序列，构建 PD-1 人源化（hPD-1）小鼠；通过 CRISPR/Cas9 技术将编码小鼠 *PD-L1* 基因 IgV 结构域的 3 号外显子全部替换为编码人 *PD-L1* 基因 IgV 结构域的序列，构建 PD-L1 人源化（hPD-L1）小鼠。然后将 hPD-1 小鼠和 hPD-L1 小鼠杂交，生成 PD-1/PD-L1 双人源化（hPD-1/hPD-L1）小鼠。同时，将编码小鼠 *C5ar1* 基因的全长序列替换为人的 *C5AR1* 基因的全长序列，构建 C5AR1 人源化（hC5AR1）小鼠。再将 hC5AR1 小鼠与 hPD-1/hPD-L1 小鼠交配，获得 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠。

2.2 ELISA 法测定 C5a 蛋白的表达

将 MC38 细胞接种于 C57BL/6 小鼠皮下，待肿瘤平均体积达到 100 mm^3 时取出肿瘤细胞，同时体外培养 MC38 细胞系。收集 MC38 细胞培养上清液和 MC38 肿瘤组织研磨液，使用 ELISA 法检测 C5a 蛋白的表达。其操作流程参照小鼠补体 C5a 的 ELISA 试剂盒（abcam，ab193718）和人补体 C5a

的 ELISA 试剂盒（abcam，ab193695）说明书。

2.3 流式细胞术（FASC）检测 C5AR1、PD-1、PD-L1 蛋白的表达，各免疫细胞亚群的比例分布以及抗人 C5AR1 抗体的结合能力

首先取 MC38 细胞系和 MC38 肿瘤组织，分析鼠源 C5AR1 蛋白的表达。之后准备 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠各 1 只，每只小鼠腹腔注射抗鼠 CD3E 抗体 7.5 μg，24 h 后取小鼠的脾细胞，使用 FACS 分别检测人和鼠 PD-1、PD-L1 的表达。另外直接取不做任何刺激的 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞，检测人和鼠 C5AR1 的表达。免疫细胞亚群分析使用 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠各 3 只，分别取外周血、脾、淋巴结，使用各免疫细胞的表面标记抗体标记后进行 FACS 分析。抗人 C5AR1 抗体（Avdoralimab）的结合实验使用 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠各 1 只，分别取小鼠的脾细胞，加入 Avdoralimab 后，使用 FACS 检测 CD11b ＋细胞表面表达的人 C5AR1。

2.4 肿瘤模型的建立和药效学分析

将 hPD-L1 MC38 细胞（0.1 mL）接种于 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠的皮下（雌性，5 ～ 8 周龄，n ＝ 6），每只小鼠共接种 5×10^4 个细胞。当肿瘤体积达到 100 ～ 150 mm^3 时，将小鼠随机分为 4 组。分组当日开始分别腹腔注射 hIgG4（3 mg • kg^{-1}）、Pembrolizumab（0.3 mg • kg^{-1}）、Avdoralimab（3 mg • kg^{-1}）、Pembrolizumab（0.3 mg • kg^{-1}） ＋ Avdoralimab（3 mg • kg^{-1}），每周 2 次，共 6 次。分组后每周 2 次测量小鼠体重和肿瘤体积。肿瘤体积＝长径 ×（短径）^{2}/2。当肿瘤体积超过 3000 mm^3 或给药后 1 周内处死小鼠，实验结束。

2.5 统计学处理

结果表示为平均值 ±*SEM*。采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。肿瘤生长趋势采用双因素方差分析，免疫细胞分型实验采用单因素方差分析。以 P ＜ 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 C5AR1 在肿瘤微环境免疫细胞中的表达

结果显示：小鼠 C5AR1 只能在肿瘤组织中的 $CD45^+$ 细胞（免疫细胞）上检测到，在体外培养的 MC38 细胞系和肿瘤组织中 $CD45^-$ 细胞（肿瘤组织中的非免疫细胞，主要是肿瘤细胞）上未检测到，见图 1A。小鼠 C5a 只能在肿瘤组织研磨液中检测到，在体外培养的 MC38 细胞上清液中未检测到，见图 1B。

3.2 人源化小鼠和人源化细胞系的构建

基于上述结果，C5AR1 在肿瘤内 $CD45^+$ 细胞上表达，而在 MC38 细胞和肿瘤内 $CD45^-$ 细胞上不表达，笔者构建了 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 人源化小鼠和 hPD-L1 MC38 人源化细胞系。hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠的基因编辑策略见图 2。人源化小鼠的每窝产仔数量与野生鼠无差异，小鼠在标准的 SPF 级屏障设施中发育正常。

3.3 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠中人 PD-1、PD-L1、C5AR1 蛋白及鼠相应蛋白的表达情况

结果显示，人 PD-1 蛋白和人 PD-L1 蛋白可以在 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠激活的 T 细胞中检测到，人 C5AR1 蛋白可以在人源化小鼠的髓系细胞中检测到，而 3 种人源蛋白在野生 C57BL/6 小鼠中都未检测到；鼠 PD-1 蛋白和鼠 PD-L1 蛋白只能在野生小鼠激活的 T 细胞中检测到，鼠 C5AR1 蛋白也只能在野生小鼠的髓系细胞中检测到，而 3 种鼠源蛋白在人源化小鼠中都未检测到（见图 3）。

3.4 人源化对主要免疫细胞发育和分化的影响

结果显示，与野生鼠比较，hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠的脾、淋巴结和外周血中 T/B 细胞、NK 细胞、树突状细胞（DCs）、单核 / 巨噬细胞 / $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞和 Treg 细胞的比例差异无统计学意义（P ＞ 0.05），见图 4。

3.5 抗体结合情况

为了验证合成的抗人 C5AR1 抗体 Avdoralimab 与人源化小鼠中的人 C5AR1 可以特异性结合，使用 FACS 检测了抗体与靶点的结合情况。结果显示，Avdoralimab 能与 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠的髓系细胞结合，但与野生小鼠不能结合，见图 5。

3.6 联合应用抗人 PD-1 和抗人 C5AR1 抗体对人源化小鼠肿瘤模型中结肠癌的影响

根据已有报道，人的 C5AR1 可以与小鼠的 C5a 结合 [14]，所以我们可以使用 C5AR1 人源化小鼠验证 C5AR1 靶点药的药效，而不用将 C5a 人源化。

结果显示，与同型对照抗体组相比，给予 Avdoralimab 组、Pembrolizumab 组、联合给药组的肿瘤抑制率分别为 19.6%、27.1%（P ＜ 0.05）和 51.8%（P ＜ 0.0001），联合给药能更有效地抑制肿瘤生长。C5AR1 抗体组在第 24 日时由于有一只小鼠死亡导致肿瘤体积减小见图 6。

4 结果与讨论

由于物种特异性，非人灵长类动物通常是唯一可用于评估生物疗法安全性的相关物种。其他替代方法，如在啮齿动物中使用同源蛋白或使用转基因或敲除小鼠，也可用于评估安全性。未来药理学和毒理学研究的重点可能是有条件的 KO

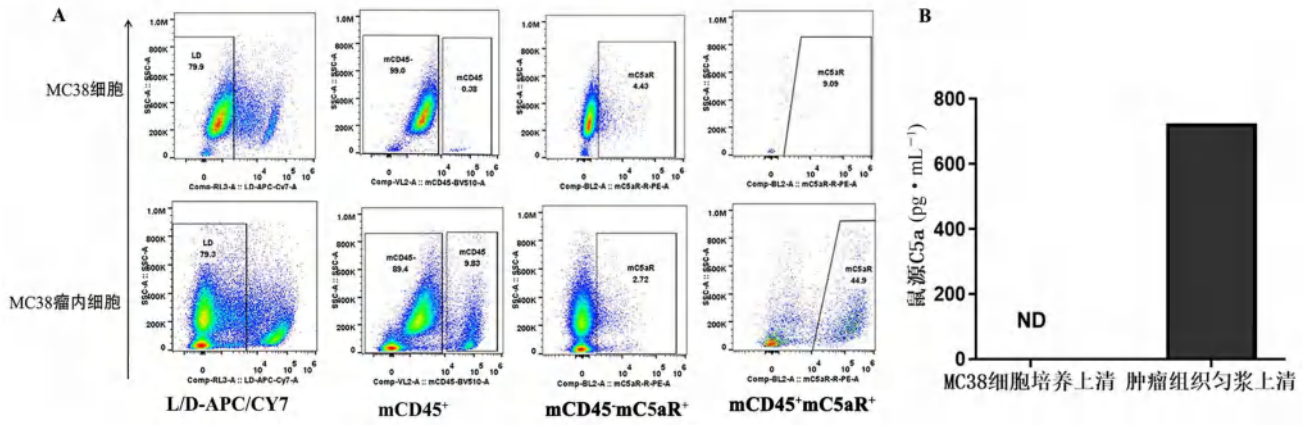


图 1 C5AR1、C5a 在 MC38 细胞培养物及 MC38 肿瘤组织中的表达

Fig 1 Expression of C5AR1 and C5a in MC38 cell culture and MC38 tumor tissue

A. C5AR1 的表达情况（the expression of C5AR1）；B. C5a 的表达情况（the expression of C5a）

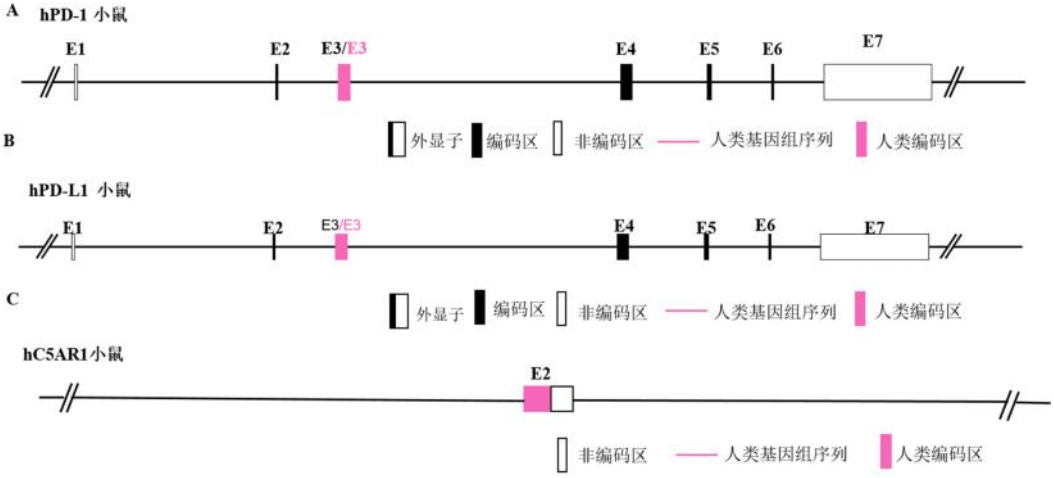


图 2 人源化小鼠的基因编辑策略

Fig 2 Gene editing strategy for humanized mice

A.hPD-1 小鼠的基因编辑策略（gene editing strategy for hPD-1 mice）；B. hPD-L1 小鼠的基因编辑策略（gene editing strategy for hPD-L1 mice）；C. hC5AR1 小鼠的基因编辑策略（gene editing strategy for hC5AR1 mice）

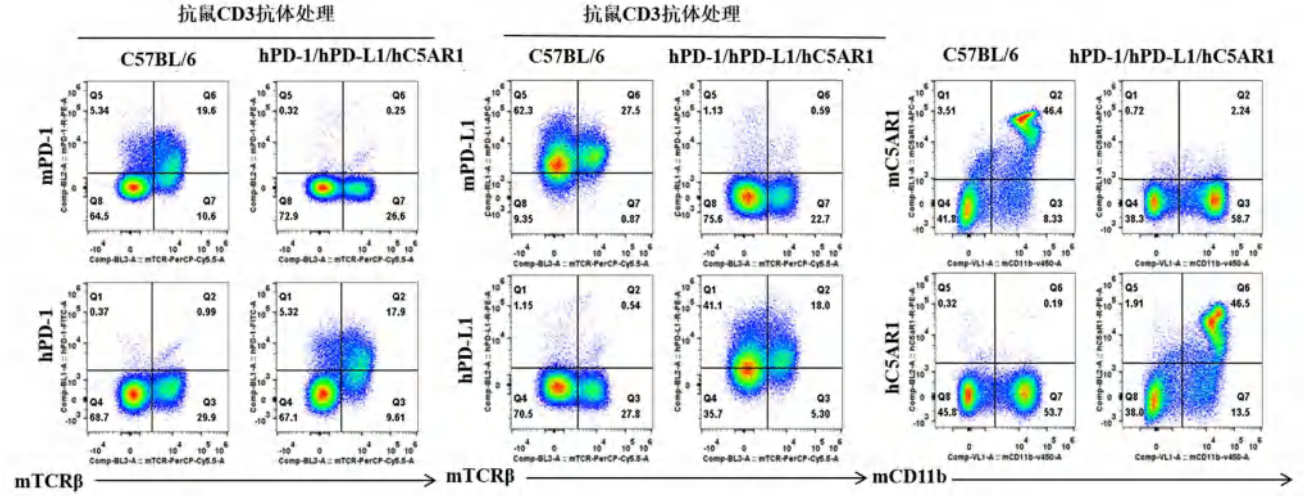


图 3 PD-1、PD-L1、C5AR1 蛋白在 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠上的表达

Fig 3 Expression of PD-1，PD-L1 and C5AR1 proteins on hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 mice

小鼠和人源化动物。人源化小鼠制造了一种或几种人类蛋白质，其他人类分子相互作用的蛋白质仍然来自小鼠。

目前有多种 C5AR1 靶点药正在开发中，用

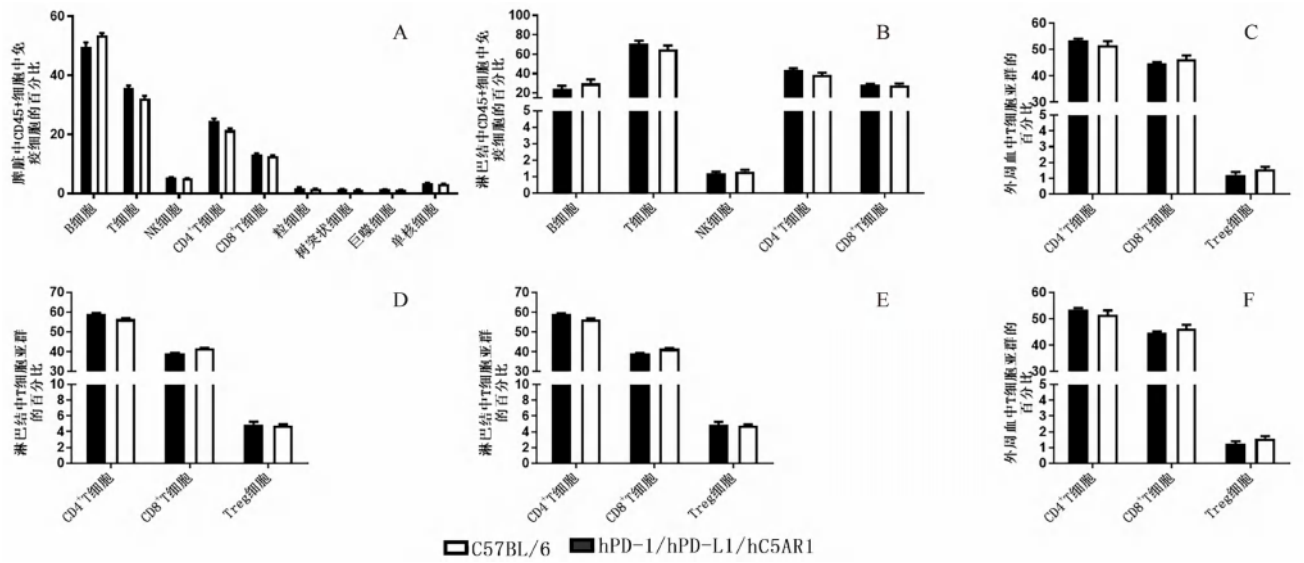


图 4　hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠的脾、淋巴结、外周血中各免疫细胞的比例

Fig 4　Proportion of leukocyte subpopulationss in spleen，lymph node，and peripheral blood of hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 mice

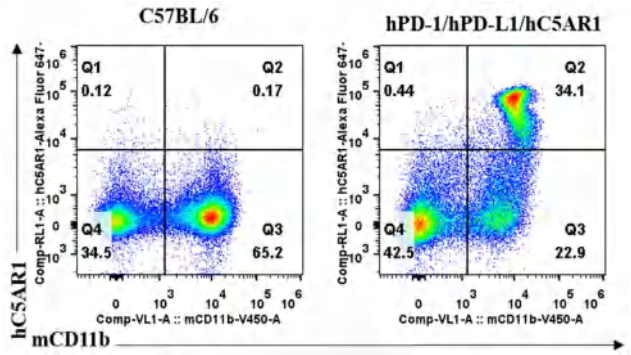


图 5　Avdoralimab 与 C5AR1 抗体结合实验

Fig 5　Antibody binding assay Avdoralimab and C5AR1

于不同的适应证，包括自身免疫性疾病、肾小球疾病、肉瘤病和肿瘤[5，15-16]。迫切需要有效的动物模型提高药物开发的临床转化率。靶点人源化小鼠是一种有效的动物模型，具有完整的免疫系统，可用于评估药物的药效和毒性[17]。另外通过基因编辑技术获得的人源化小鼠模型相对稳定，小鼠之间的差异小，实验重复性高，也有利于药物的临床前评价[18-19]。

由于小鼠 C5a 能结合人 C5AR1[14]，只需要替换 *C5ar1* 基因，获得 *C5AR1* 单基因人源化小鼠就能保证 C5a/C5AR1 信号通路的完整性，所以

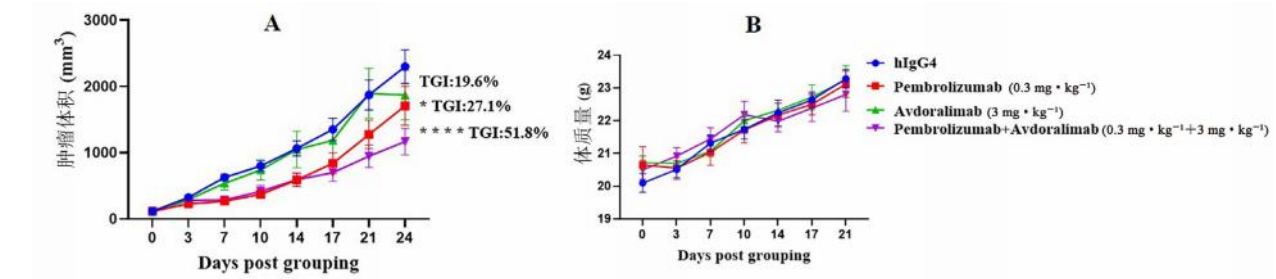


图 6　基于 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠构建的肿瘤模型验证联合使用抗人 C5AR1 抗体和抗人 PD-1 抗体的体内药效

Fig 6　Validation of the efficacy of combined anti-human C5AR1 antibody and anti-human PD-1 antibody based on hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 in tumor mouse model

本研究只构建了 *C5AR1* 单基因人源化小鼠，而不需要构建 *C5a/C5AR1* 双基因人源化小鼠就可以用于构建药效验证小鼠模型。肿瘤的发生发展具有一定的复杂性[20]，而且免疫检查点抑制剂的效率也比较低，所以本研究考虑在激活免疫效应细胞的同时抑制免疫抑制细胞，以期免疫检查点抑制剂和抗人 C5AR1 抗体能更有效地抑制肿瘤。

靶向 PD-1 和 PD-L1 的药物与靶点结合的位点一般在靶点蛋白的 IgV 区，另替换基因序列越短，对于基因编辑技术来说难度越小，所以选择了只替换阳性药 Pembrolizumab 靶向的 *PD-L1* 基因的 3 号外显子的 IgV 区的基因编辑策略。Pembrolizumab 通过与 *PD-1* 基因的 2 号外显子的 IgV 区结合而发挥作用，所以只替换了 *PD-1* 基因的 2 号外显子的 IgV 区这一部分。后续发现 PD-1 的靶向药 Nivolumab 的结合位点不在 IgV 区，百奥赛图又开发了替换整个胞外区的 PD-1 人源化小鼠。本研究将 hPD-L1 MC38 细胞接种

到 hPD-1/hPD-L1/hC5AR1 小鼠体内，结果显示，联合应用抗人 PD-1 抗体和抗人 C5AR1 抗体可以有效抑制肿瘤的生长。但在第 24 日，单独给予抗 C5AR1 抗体的小鼠出现死亡，是否是抗体的毒性导致需要进一步分析。后续需要对抗体联用与单用抑制肿瘤机制进行分析，如肿瘤微环境、脾和血中细胞毒性 T 细胞、MDSCs、中性粒细胞的数量变化；肿瘤微环境中人 C5AR1 和鼠 C5a 的表达量及各相关细胞因子的水平变化 [5] 和信号通路的变化 [21-22] 情况。另外，各抗体的最佳给药剂量也需要进一步验证。

hC5AR1 小鼠除了可以与 hPD-1/hPD-L1 小鼠交配用来验证 PD-1/PD-L1 通路抑制剂与 C5AR1 靶点药的联用，还可以与其他免疫检查点人源化小鼠交配，验证其他免疫检查点抑制剂与 C5AR1 靶向药联用或双抗的药效与毒性。因此本研究建立的人源化小鼠模型对肿瘤的免疫治疗药物的开发具有重要意义。

参考文献

[1] Sun YT，Xue J. Expression profile and biological role of immune checkpoints in disease progression of HIV/SIV infection [J]. Viruses，2022，14（3）：581.

[2] Perez-Herrero E，Fernandez-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer：drug nanocarriers，the future of chemotherapy [J]. Eur J Pharm Biopharm，2015，93：52-79.

[3] Koerner J，Horvath D，Herrmann VL，et al. PLGA-particle vaccine carrying TLR3/RIG-I ligand riboxxim synergizes with immune checkpoint blockade for effective anti-cancer immunotherapy [J]. Nat Commun，2021，12（1）：2935.

[4] Morad G，HelminK BA，Sharma P，et al. Hallmarks of response，resistance，and toxicity to immune checkpoint blockade [J]. Cell，2021，184（21）：5309-5337.

[5] Ding PP，Li L，Li LY，et al. C5aR1 is a master regulator in colorectal tumorigenesis via immune modulation [J]. Theranostics，2020，10（19）：8619-8632.

[6] Zhang Y，Wang X. Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in cancer [J]. J Hematol Oncol，2020，13（1）：165.

[7] Gupta N，Gaikwad S，Kaushik I，et al. Atovaquone suppresses triple-negative breast tumor growth by reducing immune-suppressive cells [J]. Int J Mol Sci，2021，22（10）：5150.

[8] Gadwa J，Bickett TE，Darragh LB，et al. Complement C3a and C5a receptor blockade modulates regulatory T cell conversion in head and neck cancer [J]. J Immunother Cancer，2021，9（3）：e002585.

[9] Ou B，Liu Y，Yang XW，et al. C5aR1-positive neutrophils promote breast cancer glycolysis through WTAP-dependent m6A methylation of ENO1 [J]. Cell Death Dis，2021，12（8）：737.

[10] Ajona D，Ortiz-Espinosa S，Moreno H，et al. A combined PD-1/C5a blockade synergistically protects against lung cancer growth and metastasis [J]. Cancer Discov，2017，7（7）：694-703.

[11] Zha HR，Han X，Zhu Y，et al. Blocking C5aR signaling promotes the anti-tumor efficacy of PD-1/PD-L1 blockade [J]. Oncoimmunology，2017，6（10）：e1349587.

[12] Ma LL，Gai JW，Qiao P，et al. A novel bispecific nanobody with PD-L1/TIGIT dual immune checkpoint blockade [J]. Biochem Biophys Res Commun，2020，531（2）：144-151.

[13] Han D，Xu YF，Zhao XP，et al. A novel human anti-TIGIT monoclonal antibody with excellent function in eliciting NK cell-mediated antitumor immunity [J]. Biochem Biophys Res Commun，2021，534：134-140.

[14] Lee H，Zahra D，Vogelzang A，et al. Human C5aR knock-in mice facilitate the production and assessment of anti-inflammatory monoclonal antibodies [J]. Nat Biotechnol，2006，24（10）：1279-1284.

[15] Carvelli J，Demaria O，Vely F，et al. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis [J]. Nature，2020，588（7836）：146-150.

[16] Niyonzima N，Rahman J，Kunz N，et al. Mitochondrial C5aR1 activity in macrophages controls IL-1beta production underlying sterile inflammation [J]. Sci Immunol，2021，6（66）：eabf2489.

[17] Cogels MM，Rouas R，Ghanem GE，et al. Humanized mice as a valuable pre-clinical model for cancer immunotherapy research [J]. Front Oncol，2021，11：784947.

[18] De La Rochere P，Guil-Luna S，Decaudin D，et al. Humanized mice for the study of immunooncology [J]. Trends Immunol，2018，39（9）：748-763.

[19] Fujiwara S. Humanized mice：a brief overview on their diverse applications in biomedical research [J]. J Cell Physiol，2018，233（4）：2889-2901.

[20] Shim H. Bispecific antibodies and antibody-drug conjugates for cancer therapy：technological considerations [J]. Biomolecules，2020，10（3）：360.

[21] Zheng JM，Zhou HX，Yu HY，et al. By increasing the expression and activation of stat3，sustained c5a stimulation increases the proliferation，migration，and invasion of rcc cells and promotes the growth of transgrafted tumors [J]. Cancer Manag Res，2021，13：7607-7621.

[22] Zheng QY，Liang SJ，Xu F，et al. C5a/C5aR1 pathway is critical for the pathogenesis of psoriasis [J]. Front Immunol，2019，10：1866.

（收稿日期：2023-02-14；修回日期：2023-05-06）

18α-甘草次酸的微波辅助合成及工艺优化

戚蕊，薛康，褚福浩，苏进，孙宇菲，伊冰清*，赵国栋*，雷海民*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 将微波合成技术应用于高附加值中药单体 18α-甘草次酸的制备，以建立更高效、经济的工艺路线。**方法** 以天然来源丰富且廉价的 18β-甘草次酸为原料，通过微波辐射促进 C-18β 的构型翻转，实现 18α-甘草次酸的制备，利用 HRMS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、HPLC、旋光和熔点进行结构确认及纯度鉴定；首次实现双键移位副产物的分离并通过 X-单晶衍射确认结构，辅助推测反应机制使过程更清晰。**结果** 相比于传统加热，微波辅助技术极大提高了制备效率，以 5.0 g 反应原料为例，反应温度 120 ℃，反应时间 20 min；简化了后处理操作，重结晶溶剂 200 mL，回流时间 30 min。**结论** 微波辅助合成法是目前 18α-甘草次酸高效、经济的制备方法，符合绿色化学的理念；双键移位副产物的首次分离和结构鉴定，弥补了相关研究的空白，为后续质量控制奠定了基础。

关键词：18β-甘草次酸；18α-甘草次酸；微波辅助合成；双键移位副产物
中图分类号：R914，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1769-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.013

Microwave-assisted synthesis and process optimization of 18α-glycyrrhetinic acid

QI Rui, XUE Kang, CHU Fu-hao, SU Jin, SUN Yu-fei, YI Bing-qing*, ZHAO Guo-dong*, LEI Hai-min* (*School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488)

Abstract: Objective To develop an economic and efficient route for 18α-glycyrrhetinic acid synthesis with the assistance of microwave, a high-value traditional Chinese medicine monomer. **Methods** Cheap and numerous 18β-glycyrrhetinic acid was used as the starting material. Microwave irradiation helped accelerate the stereocenter inversion of C-18β to furnish 18α-glycyrrhetinic acid with the confirmation of HRMS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HPLC, optical rotation and melting point. Notably, side-products with double-bond migration were isolated and characterized by X-ray diffraction for the first time, which facilitated the mechanism analysis. **Results** Compared to the conventional heating protocol, the efficiency was significantly improved, taking 5.0 g of reaction raw materials as an example, the reaction temperature reached 120 ℃ and the reaction time was 20 min, post work procedure simplified, the recrystallization solvent was 200 mL, and the reflux time was 30 min. **Conclusion** Microwave-assisted 18α-glycyrrhetinic acid synthesis is now the most efficient and economic protocol for currently, which is in accordance with the principle of green chemistry. Furthermore, first characterization of side-products has filled the previous research gap, laying foundation for futher quality control.

Key words: 18β-glycyrrhetinic acid; 18α-glycyrrhetinic acid; microwave-assisted synthesis; side-product with double-bond migration

基金项目：“北京市科技新星”人才项目（No.Z211100002121128）；国家自然科学基金资助项目（No.82274082）。
作者简介：戚蕊，女，在读硕士研究生，主要从事绿色化学与中药单体制备研究，email：18810057921@163.com *通信作者：赵国栋，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事绿色化学与中药单体制备研究，email：202001036@bucm.edu.cn；伊冰清，女，实验师，主要从事分析测试研究，email：bingqingyi@126.com；雷海民，男，研究员，博士研究生导师，主要从事中药先导化合物研究与开发，email：hm_lei@126.com

甘草（Glycyrhiza glabra）在《神农本草经》中被列为上品[1-2]，是历史悠久、分布广泛的天然药用植物[3-4]。其味甘、平，归心、肺、脾、胃经，具有补脾益气，清热解毒，祛痰止咳，缓急止痛等功效[5]。

甘草酸是一种三萜皂苷，为甘草的主要活性成分之一，口服后经肠道细菌降解为甘草次酸，进而发挥各种药理活性[6-7]，如保肝、抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗炎等，同时具有类固醇样作用，能够调节免疫、抗动脉粥样硬化[8-12]。天然甘草次酸包括 C18β 和 C18α 两种异构体，虽然 18α-甘草次酸天然含量极低（约为 18β 异构体的 3%[13-14]），但具有比 18β 异构体更强的肝靶向活性[15-16]，且长期服用不会出现 18β 异构体导致的水钠潴留。其原因在于，18α-甘草次酸可以在抑制 11β-羟基类固醇脱氢酶 1 活性的同时不抑制 11β-羟基类固醇脱氢酶 2，而 18β 异构体没有这种选择性[17]。此外，18α-甘草次酸有助于代谢性疾病的治疗，如内脏肥胖、血脂异常、2 型糖尿病和心血管并发症。

天然含量极低导致了 18α-甘草次酸不易获得、价格昂贵，因此使用廉价丰富的 β 异构体进行半合成是得到 α 异构体的常用方法[18-20]。然而，已报道的传统方法往往需要超高温（220 ℃）和长时间加热（长达 4 h）以实现构型翻转（18β → 18α），且重结晶时需要长时间回流，消耗大量溶剂[18-20]。本实验创新性地将微波辐射应用于 C18 位构型反转并改良了后处理操作，极大地提高了 18α-甘草次酸的制备效率，为进一步工业化放大生产奠定了基础。此外，首次分离并通过 X-单晶衍射鉴定出双键移位副产物（传统加热法也产生，但从未报道），填补了相关研究的空白，有助于推测翻转反应机制和制订质量标准。

1 仪器与试药

微波反应仪（美国 CEM 公司）；RCT 双线恒温加热磁力搅拌器（德国 IKA 公司）；RE-3000B 型旋转蒸发器（日本 EYELA 有限公司）；KQ-100 型超声清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）；BSA224S-CW 型分析天平（德国赛多利斯公司）；X-5 显微熔点测定仪（北京泰克仪器有限公司）；数显恒温油浴（北京健力园医疗器械有限公司）；Bruker Avance 400 型核磁共振仪、ALPHA FTIR 红外光谱仪（瑞士 Bruker 公司）；Agilent Q-TOF 质谱仪、Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；SGW-2 自动旋光仪（美国鲁道夫公司）。

18β-甘草次酸、二甘醇（安耐吉化学有限公司）；柱层析硅胶（200 ～ 300 目），硅胶 GF 254 预制薄层板（20 cm×20 cm，青岛海洋化工）；色谱乙腈（Fisher 公司）；氢氧化钾、二氯甲烷、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、无水乙醇、盐酸（分析纯，北京化工厂）。

2 方法与结果

微波合成技术已成为制备有机小分子、聚合物、无机材料和纳米材料的一种高效合成方法。与传统加热法相比，微波辐射具有瞬时快速加热（深层加热）、温度均匀一、高精度等优势[21-22]。本文尝试将微波合成技术应用于 18β-甘草次酸构型翻转（18β → 18α），以期改善传统加热法存在的加热温度高、反应时间长、后处理烦琐等问题。

2.1 微波辅助下 18α-甘草次酸合成工艺优化

2.1.1 反应条件筛选 为探究微波对 18β-甘草次酸构型翻转的影响，基于单一变量的原则，采用与传统加热法相同的条件，以二甘醇为反应溶剂，加入氢氧化钾（KOH），考察氢氧化钾的不同用量、反应温度、反应时间和微波功率对收率的影响（结果见图 1 及表 1）。具体操作如下：将 18β-甘草次酸（**2**，0.47 g，1 mmol）和适量 KOH 溶于二甘醇（2 mL）中，在微波加热条件下充分搅拌，冷却至室温后加入稀盐酸（0.5 mol·L^{-1}，20 mL），过滤收集沉淀、水洗除酸，采用乙醇（100 mL，分 3 次加入）重结晶，计算收率。值得注意的是，由于构型翻转（18β → 18α）是可逆反应，因此 50% 的产率已是较好结果。结果见表 1，产率随 KOH 用量增加呈先升高后下降的趋势，最佳 KOH 用量为原料的 4 倍当量。此外，产率随反应温度升高先增加后基本维持恒定，从降低能耗角度考虑，最佳反应温度为 120 ℃。产率随反应时间呈先上升后下降的趋势，且薄层色谱（TLC）监测发现，随时间延长副产物会逐渐增多，因此最佳微波辐射时间为 20 min。控制实验显示，微波辐射是促进构型翻转（18β → 18α）的最关键因素：在失去微波条件下[20-22]，反应温度需增加 100 ℃，时间延长 12 倍才能取得相似效果；随微波功率增加，产率呈先升高后基本恒定的趋势，从低能耗角度考虑，最佳微波功率为 150 W。

2.1.2 重结晶条件优化 选取乙醇为重结晶溶剂，但操作时发现沉淀难以溶解，0.5 g 18β-甘草次酸为原料反应得到的粗产物就需要长时间回流（6 h）下分多次加入乙醇（50 mL ＋ 30 mL ＋ 20 mL）。为此，

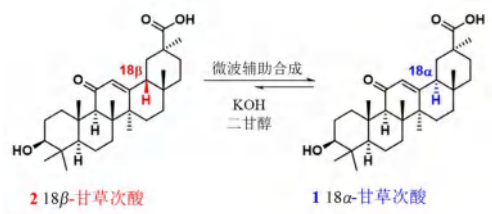


图 1　微波辅助下 18α- 甘草次酸的合成

Fig 1　Synthesis of 18α-glycyrrhetinic acid under microwave condition

表 1　微波辅助下 18α- 甘草次酸合成条件

Tab 1　Synthesis condition of 18α-glycyrrhetinic acid under microwave condition

组别	KOH/eq	温度 /℃	时间 /min	功率 /W	收率 /%
1	2	100	20	150	＜ 5
2	3	100	20	150	＜ 5
3	4	100	20	150	49
4	5	100	20	150	34
5	4	80	20	150	39
6	4	120	20	150	52
7	4	140	20	150	53
8	4	120	10	150	31
9	4	120	30	150	41
10	4	120	40	150	24
11	4	120	20	无功率	＜ 5
12	4	120	20	50	32
13	4	120	20	250	54
14[18-20]	3.35 ～ 3.55	220	240	无功率	43 ～ 53

在最优微波辅助条件下，筛选不同溶剂种类、用量和回流时间对重结晶的影响，结果见表 2，将甲醇和二氯甲烷以 1∶1（*V*/*V*）混合，可以在极大减少溶剂体积、缩短回流时间条件下取得相似收率（51%）。

表 2　18α- 甘草次酸重结晶溶剂筛选

Tab 2　Solvent screening for recrystallization of 18α-glycyrrhetinic acid

组别	溶剂	体积 /mL	回流时间 /h	收率 /%
1	乙醇	100	6	52
2	甲醇	100	4	53
3	二氯甲烷	80	3	42
4	甲醇 - 二氯甲烷＝ 1∶1	20	0.5	51
5	乙腈	130	＞ 8	35
6	乙酸乙酯	150	＞ 8	30

2.2　18α- 甘草次酸的合成放大实验及结构表征

2.2.1　微波辅助下的 18α- 甘草次酸合成放大　在前期工艺优化基础上，进一步考察微波在放大反应中的应用：将 18β- 甘草次酸（5.0 g，10.6 mmol）和氢氧化钾（2.38 g，42 mmol）在二甘醇（20 mL）中混匀，120 ℃下微波辐射（150 W）搅拌 20 min 后停止反应。冷却至室温，加入稀 HCl 水溶液（0.5 mol • L^{-1}，200 mL），过滤收集沉淀，去离子水洗涤。将 200 mL 混合溶剂（甲醇 - 二氯甲烷＝ 1∶1，*V*/*V*）加入上述沉淀，加热回流下搅拌 30 min 后放冷，过滤得白色晶体 2.55 g，收率 51%，与小量制备一致（见表 2）。所得滤液浓缩后分离并鉴定。熔点为 340 ～ 341 ℃（文献值[20]：338 ～ 340 ℃）。$[\alpha]_D^{20}$＝＋ 77.5°（*c* ＝ 0.1，EtOH）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO，d_6）δ：12.16（s，1H），5.33（s，1H），4.30（d，*J* ＝ 5.1 Hz，1H），3.03 ～ 2.99（m，1H），2.48 ～ 2.43（m，1H），2.29 ～ 2.25（m，2H），1.94 ～ 1.84（m，1H），1.82（td，*J* ＝ 13.6，3.9 Hz，1H），1.70 ～ 1.58（m，2H），1.56 ～ 1.35（m，9H），1.33（s，3H），1.31 ～ 1.18（m，3H），1.16（s，3H），1.09（s，3H），1.04（s，3H），1.00 ～ 0.93（m，1H），0.90（s，3H），0.69（s，3H），0.67 ～ 0.66（m，1H），0.65（s，3H）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO，d_6）δ：199.2，179.9，166.6，123.5，77.1，60.4，54.6，45.2，43.8，42.0，40.6，39.2，38.9，37.1，36.9，35.7，35.6，33.7，31.9，28.8，28.6，27.4，26.7，21.1，20.9，18.7，17.7，16.9，16.6，16.1。HRMS（ESI$^+$）（*m*/*z*）calcd. for $C_{30}H_{47}O_4$ [M ＋ H]$^+$ 471.3469；found 471.3474（见图 2 ～ 3）。

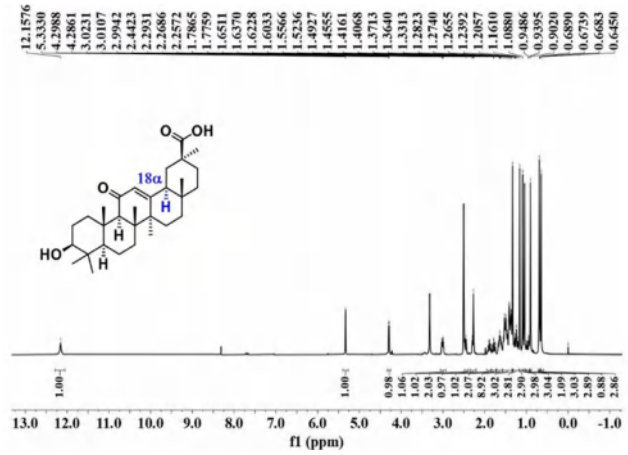


图 2　18α- 甘草次酸的 ^{1}H-NMR 图

Fig 2　^{1}H-NMR spectrum of 18α-glycyrrhetinic acid

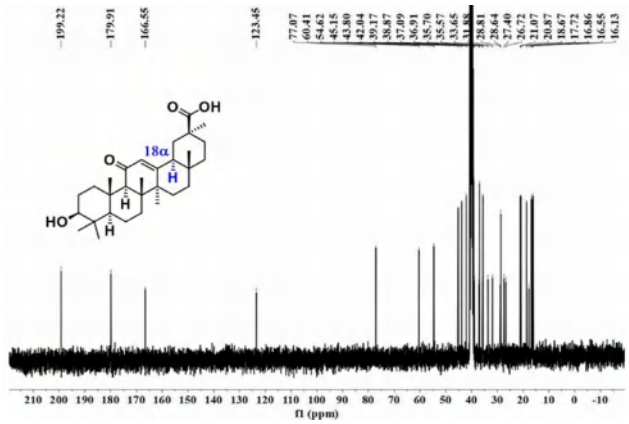


图 3　18α- 甘草次酸的 ^{13}C-NMR 图

Fig 3　^{13}C-NMR spectrum of 18α-glycyrrhetinic acid

色谱柱：Agilent ZORBAX SB-C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相为 0.02 mol·L^{-1} 乙酸铵溶液 - 乙腈＝50∶50（*V*/*V*）；流速：1.0 mL·min^{-1}；进样量：10 μL；检测波长：254 nm；柱温：25 ℃。色谱图见图 4。

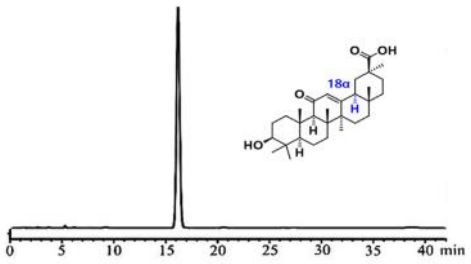


图 4 18*α*- 甘草次酸的 HPLC 图

Fig 4 HPLC spectrum of 18*α*-glycyrrhetinic acid

2.2.2 微波与传统加热法对比分析 为系统总结微波法优势，依据参考文献[18-20]开展 18*α*- 甘草次酸传统加热制备：将 KOH（2.0 g，35.7 mmol）加入二甘醇（15 mL）中，在 100 ℃下加热搅拌 15 min 后加入 18*β*- 甘草次酸（**2**，5.0 g，10.6 mmol），220 ℃下继续搅拌 4 h。冷却至室温后，加入稀盐酸水溶液（0.5 mol·L^{-1}，200 mL），过滤收集沉淀，去离子水洗涤除酸，热丙酮洗涤高温色素后得浅棕色固体。在加热回流条件下（8 h）分次加入乙醇（0.5 L＋0.3 L＋0.2 L）充分溶解固体，放冷后析出白色晶体，过滤可得 18*α*- 甘草次酸（**1**，2.65 g，53%）。将滤液浓缩后柱层析分离并鉴定。

而前文所述微波辅助反应条件为：反应温度为 120 ℃，反应时间 20 min；使用新的重结晶溶剂（甲醇 - 二氯甲烷＝1∶1，*V*/*V*）时，用量仅为 200 mL，且加热回流时间为 30 min。

与传统加热法对比后发现微波辅助法优势明显：反应时间缩短至传统加热的 1/12，反应温度降低 100 ℃，重结晶溶剂用量缩减至 1/5，重结晶回流时间缩短至 1/16。因此，微波辅助法具有更高的效率、更低的成本和更广阔的应用前景。

2.3 副产物结构鉴定及反应机制分析

2.3.1 副产物结构鉴定 在 TLC 检测过程中，发现微波辅助和传统加热均会产生同一副产物：该杂质在 254 nm UV 下无荧光，但能被磷钼酸显色，推测分子内共轭体系（*α*，*β*- 不饱和酮）被破坏。值得注意的是，该副产物在国内外文献中从未被报道或提及。

将传统加热法所得滤液浓缩，经柱层析分离（乙酸乙酯 - 正己烷＝1∶3 ～ 1∶1，*V*/*V*）后得白色固体副产物 **3**（0.55 g，11%）；相似操作在微波辅助反应中也可得副产物 **3**（0.5 g，10%）。熔点为 298 ～ 299 ℃。$[\alpha]_D^{20}$ ＝ ＋ 74.0°（*c* ＝ 0.1，EtOH）。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）*δ*：3.38（d，*J*＝17.9 Hz，1H），3.24（dd，*J*＝12.4，5.2 Hz，1H），2.83（dd，*J* ＝ 16.6，2.4 Hz，1H），2.53 ～ 2.44（m，2H），2.32（s，1H），2.21（dd，*J* ＝ 14.4，2.3 Hz，1H），2.05（td，*J* ＝ 14.9，13.7，4.2 Hz，1H），1.83（td，*J* ＝ 13.7，4.1 Hz，1H），1.67 ～ 1.62（m，1H），1.62 ～ 1.45（m，8H），1.43 ～ 1.38（m，1H），1.38 ～ 1.32（m，1H），1.30（s，3H），1.27 ～ 1.16（m，2H），1.15（s，3H），1.06（s，3H），1.04（s，3H），0.99（s，3H），0.94 ～ 0.89（m，1H），0.80（s，3H），0.79（s，3H），0.66 ～ 0.61（m，1H）。^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）*δ*：209.4，183.7，132.7，79.3，63.7，54.9，44.8，44.5，44.2，42.9，39.1，38.7，37.9，37.1，36.3，34.8，33.4，32.8，29.9，28.3，27.3，25.9，24.1，20.7，19.7，19.0，18.2，16.4，15.7。HRMS（ESI^+）（*m*/*z*）calcd. for $C_{30}H_{47}O_4$ $[M+H]^+$ 471.3469；found 471.3457。

对比 ^{13}C 和 DEPT-135 谱图（见图 5 ～ 6），发现 C ＝ C 片段仍存在于副产物 **3** 中，故推测可能发生了双键迁移。进一步通过 X- 单晶衍射技术，证实了双键移位至 C13 ～ C18 号位。晶体参数见表 3（剑桥晶体数据库中心：CCDC-2225066），分子结构椭球图如图 7 所示。

2.3.2 反应机制研究 通过产物 **1** 及副产物 **3** 的结构确认，结合电子转移机制，推测反应机制见图 8：原料 18*β*- 甘草次酸的羰基在碱性条件下通过“羰基 - 烯醇”互变异构为具有较大共轭体系的烯醇式过渡态Ⅰ，再经“烯醇 - 羰基”互变，转化为较稳定且具有共轭体系的酮式异构体（18*β*- 甘草次酸和 18*α*- 甘草次酸），若氢离子从“面上”接近过渡态，产物为 18*β*- 甘草次酸，若氢离子从“面下”接近过渡态，产物为 18*α*- 甘草次酸。但上述可逆反应达到平衡态前，过渡态Ⅰ会互变异构成少量酮式副产物 **3**；由于缺乏稳定的共轭体系（*α*，*β*- 不饱和酮），副产物 **3** 能量较高且不易大量产生，加之在紫外灯下没有显色吸收使其不易被发现，因此从未有文献报道过该副产物。副产物 **3** 的鉴定不仅有助于推测反应机制，也为后续 18*α*- 甘草次酸的工艺制备和质量控制奠定了基础。

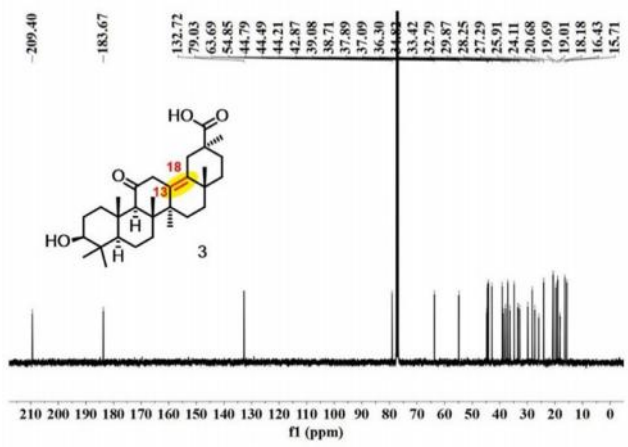


图 5　副产物 **3** 的 ^{13}C-NMR 图

Fig 5　^{13}C-NMR spectra of side-product **3**

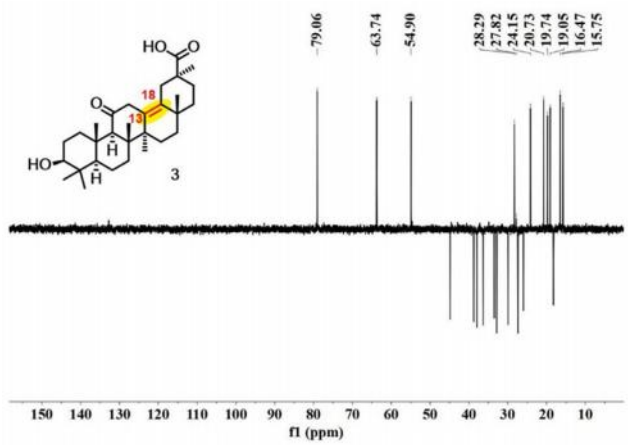


图 6　副产物 **3** 的 DEPT-135 图

Fig 6　DEPT-135 spectrum of side-product **3**

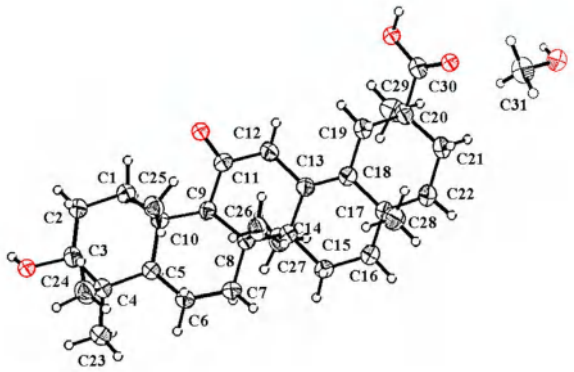


图 7　副产物 **3** 的分子结构图

Fig 7　Molecular structure of side-product **3**

表 3　副产物 3 的晶体参数

Tab 3　Crystal data for side-product 3

参数	值
化学式	$C_{31}H_{50}O_5$
相对分子质量	502.71
温度 /K	193.00
晶系	Triclinic
空间群	$P2_12_12_1$
a/Å	7.5942（10）
b/Å	16.217（2）
c/Å	22.529（3）
α/°	90
β/°	90
γ/°	90
V/Å^3	2774.6（6）
单位晶胞中所含分子个数	4
单胞密度 /cm^3	1.203
衍射线波长 /mm^{-1}	0.399
单胞中电子的数目	1104.0
结晶维度	0.13 mm×0.12 mm×0.1 mm
衍射指标	$-9 \leqslant h \leqslant 9$，$-20 \leqslant k \leqslant 21$，$-29 \leqslant l \leqslant 27$
收集衍射点	33816
独立衍射点	6238 [$R_{int} = 0.0599$，$R_{sigma} = 0.0459$]
对于可观测衍射点的残差因子 *R* 值 [$I \geqslant 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0511$，$wR_2 = 0.1324$
对于全部衍射点的残差因子 *R* 值 [all data]	$R_1 = 0.0702$，$wR_2 = 0.1441$

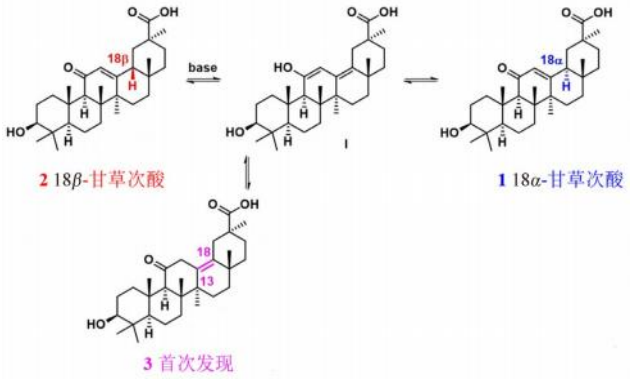


图 8　18*β* 构型翻转及副产物生成机制解析

Fig 8　Configuration inversion of C-18*β* and mechanism for generation of side-products

3　讨论

甘草是最常用的传统中药材之一，其指标性成分甘草次酸包括 18*β* 和 18*α* 两种差向异构体，其中 18*α*-甘草次酸因具有优异的生理活性、更强的肝靶向性和更轻的不良反应而受到学术界普遍关注。然而 18*α*-甘草次酸天然含量极低，通过化学手段将天然来源丰富的 18*β* 异构体手性翻转（*β*→*α*）是其最有效的制备途径。与传统加热法相比，本实验通过微波辅助和优化纯化方法，极大地提高了制备效率：反应温度降低了 100 ℃（220 ℃→120 ℃），反应时间缩短至 1/12（240 min→20 min），重结晶溶剂用量降至 1/5（1000 mL→200 mL），加热回流时间缩短至 1/16（480 min→30 min），展现出广阔的应用前景。此外，作者首次分离了副产物 **3** 并进行了结构表征和 X-单晶衍射鉴定，发现了双键移位现象，不仅有助

于理清反应机制，更为后续 18α-甘草次酸工艺标准的建立和质量控制提供了依据。此外，作者将 18α-甘草次酸与抗肿瘤活性片段拼合，制备得到一系列衍生物，展现出较好的靶向性和抗肿瘤活性，深入的药理机制研究还在进行，相关成果会陆续发表。

参考文献

[1] 史栋，李堂秀，吴宁，等 . 不同产地甘草 HPLC 特征图谱研究 [J]. 湖北中医药大学学报，2023，25（1）：41-45.

[2] 李宏，唐中伟，袁建琴，等 . 正交设计与响应面法优化甘草多糖提取工艺的研究 [J]. 轻工科技，2023，39（1）：4-9.

[3] 李娜，张晨，钟赣生，等 . 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物（Q-Marker）预测分析 [J]. 中草药，2021，52（24）：7680-7692.

[4] 马鸿雁，邓雨娇，马倩，等 . 甘草的研究概况 [J]. 中药与临床，2018，9（1）：59-62.

[5] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：88-89.

[6] 田中佳，李小兰，李昊，等 . 甘草甜素抑癌作用及机制的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学，2022，30（24）：4544-4548.

[7] 宋玮，郑伟，张洁，等 . 中药皂苷类成分的体内代谢研究进展 [J]. 药学学报，2018，53（10）：1609-1619.

[8] 刘靖丽，闫浩，王钰莹，等 . 甘草皂苷类化合物结构与保肝活性关系的 DFT 研究 [J]. 天然产物研究与开发，2020，32（9）：1515-1521.

[9] 杜烨湘，罗敏，冯敏，等 . 甘草素通过抗炎发挥对阿尔茨海默病的保护作用 [J]. 免疫学杂志，2019，35（4）：327-333.

[10] 李冀，李想，曹明明，等 . 甘草药理作用及药对配伍比例研究进展 [J]. 上海中医药杂志，2019，53（7）：83-87.

[11] 王强，霍艳明 . 甘草升高血压的机制及应用注意事项 [J]. 医学综述，2020，26（12）：2402-2405，2410.

[12] 李立文，张嘉丽，董杨，等 . 甘草酸、甘草次酸假性醛固酮作用和药物相互作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（10）：216-220.

[13] 木合布力·阿布力孜，郑大成，热娜·卡斯木，等 . 甘草次酸类化合物的制备和抗肿瘤活性研究 [J]. 新疆医科大学学报，2012，35（2）：125-133.

[14] 韩德恩，辛玉凤，田萍，等 . 甘草次酸修饰大黄素纳米结构脂质载体制备及药动学和肝靶向评价 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（2）：136-141.

[15] 梁俊杰，夏国园，程祖胜，等 . 甘草次酸的肝靶向应用进展 [J]. 广东医学，2019，40（17）：2554-2557.

[16] 梁劲康，吴志玲，吴广辉，等 . 甘草次酸的抗肝癌作用机制及其作为肝靶向配体的研究进展 [J]. 中国药房，2017，28（22）：3150-3154.

[17] Classen-Houben D，Schuster D，Da CT，et al. Selective inhibition of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1 by 18α-glycyrrhetinic acid but not 18β-glycyrrhetinic acid [J]. Mol Biol，2009，113（3-5）：248-252.

[18] Ullah N，Seebacher W，Haslinger E，et al. Synthesis and hemolytic properties of lactosides of glycyrrhetic acid derivatives [J]. Monatshefte Fuer Chemie，2002，133：139-150.

[19] Heller L，Sommerwerk S，Tzschöckell F，et al. First occurrence of a furano-glycyrrhetinoate and its cytotoxicity [J]. Arch Pharm，2015，348（12）：889-896.

[20] Beseda I，Czollner L，Shah PS，et al. Synthesis of glycyrrhetinic acid derivatives for the treatment of metabolic diseases [J]. Bioorgan Med Chem，2010，18（1）：433-454.

[21] 肖舒宁，霍梦佳，程学健，等 . 微波法高效光催化材料合成研究进展 [J]. 硅酸盐学报，2023，51（1）：82-93.

[22] 王顺，王辉，赵小萱，等 . 微波合成分子筛系统的研制及试验 [J]. 真空电子技术，2022，357（2）：102-106.

（收稿日期：2023-01-20；修回日期：2023-03-20）

香烟烟雾和白藜芦醇对大鼠血压的影响和机制研究

王婷[1]，陈雨萌[1]，李倩[1]，张睿哲[1]，刘维海[2]，王川[1*]（1. 陕西中医药大学药学院，陕西　咸阳　712046；2. 陕西中医药大学附属医院，陕西　咸阳　712000）

摘要：目的　研究香烟烟雾和白藜芦醇对大鼠血压的影响及机制。**方法**　离体血管环技术研究香烟烟雾颗粒对 5- 羟色胺（5-HT）受体介导的平滑肌收缩功能的影响，与 SIRT1 激活剂白藜芦醇或 AMPK 激活剂 AICAR 共培养检测 5-HT_{1B} 受体以及 SIRT1 相关信号通路相关蛋白的表达。大鼠被动吸烟模型研究白藜芦醇对香烟烟雾暴露诱导的血压，平滑肌收缩功能及相关蛋白的影响。**结果**　香烟烟雾颗粒能增强 5-HT 引起的血管收缩和 5-HT_{1B} 受体蛋白表达，白藜芦醇和 AICAR 能抑制香烟烟雾颗粒诱导的血管收缩并降低 5-HT_{1B} 受体的表达。动物实验结果表明，白藜芦醇能降低香烟烟雾暴露诱导的血压升高，降低 5-HT_{1B} 受体蛋白表达，升高 SIRT1 和 p-AMPK 蛋白表达。**结论**　香烟烟雾上调 5-HT 受体诱导大鼠血压升高和动脉平滑肌收缩，白藜芦醇可以降低香烟烟雾诱导的血压升高和平滑肌收缩。

关键词：香烟烟雾；大鼠肠系膜动脉；5- 羟色胺受体；SIRT1；白藜芦醇
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1775-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.014

Effect and mechanism of cigarette smoking and resveratrol on blood pressure in rats

WANG Ting[1], CHEN Yu-meng[1], LI Qian[1], ZHANG Rui-zhe[1], LIU Wei-hai[2], WANG Chuan[1*] (1. *College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi* 712000)

Abstract: Objective　To determine the effect and mechanism of cigarette smoking and resveratrol on blood pressure in rats. **Methods**　The effect of cigarette smoking particles (DSP) on smooth muscle contraction mediated by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor was studied by in vitro vascular myograph. The expression of 5-HT_{1B} receptor and protein expression of SIRT1 signaling pathway were detected by Western blot in culture with SIRT1 activator resveratrol or AMPK activator AICAR. The effects of SIRT1 activator resveratrol on the blood pressure, smooth muscle contraction function and related proteins induced by cigarette smoking exposure were studied in passive smoking rat model. **Results**　DSP enhanced the vasoconstriction induced by 5-HT and increased the protein expression of 5-HT_{1B} receptors. resveratrol and AICAR inhibited DSP-induced vasoconstriction and decreased the expression of 5-HT_{1B} receptors. Animal experiments showed that resveratrol decreased the blood pressure, decreased 5-HT_{1B} receptor protein expression and increased SIRT1 and p-AMPK protein expression induced by cigarette smoke exposure. **Conclusion**　Cigarette smoke may up-regulate 5-HT receptors induced blood pressure increase and arterial contraction in rats, and resveratrol reduce cigarette smoke-induced blood pressure increase and smooth muscle contraction.

Key words: cigarette smoking; rat mesenteric artery; 5-hydroxytryptamine receptor; SIRT1; resveratrol

基金项目：陕西省教育厅一般专项项目（No. 22JK0348）；陕西省科技厅一般项目 - 青年项目（No. 2023-JC-QN-0821）；陕西省科技厅社会发展领域项目（No. 2022SF-207）；国家自然科学基金项目（No. 81800401）；大学生创新创业训练计划项目（No. S202210716003）。
作者简介：王婷，女，在读硕士研究生，主要从事心血管疾病相关研究，email：1942862876@qq.com　*通信作者：王川，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事心血管疾病相关研究，email：wangchuan@sntcm.edu.cn

吸烟是世界上最大的公共健康威胁之一，严重危害人类健康[1]。《中国吸烟危害健康报告2020》报道，我国吸烟人数超过3亿，每年有100多万人因烟草失去生命[2]。香烟烟雾中含有4000多种化学物质，不仅会引起慢性阻塞性肺疾病、支气管炎、哮喘和肺癌等呼吸系统疾病，还会导致动脉粥样硬化、脑卒中、冠心病及高血压等心血管疾病[3-4]。研究表明，吸烟可以显著增加高血压的发病风险[5-6]。5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）在人体中枢及外周组织中分布广泛，5-HT及其受体在心血管功能调节中存在重要的作用，研究表明中风或者高血压患者血浆中的5-HT水平显著增加，5-HT可以引起血管收缩，目前认为其诱导的血管收缩是5-HT_{1B}受体所介导。5-HT_{1B}是介导血管收缩和维持血管张力的主要受体亚型[7-9]。沉默信息调节因子SIRT1属于NAD^+依赖的去乙酰化酶，可调节细胞增殖、凋亡、分化、衰老和代谢，SIRT1通路的激活可以舒张血管，降低血压。研究表明吸烟者SIRT1的表达水平显著降低[10-11]。白藜芦醇（resveratrol，RSV）存在于虎杖、葡萄、花生等植物中，属于多酚类天然化合物，是一种SIRT1激活剂，不仅有较强的心血管保护作用，还具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗衰老和抗神经退行性变性疾病等药理作用[12-13]。白藜芦醇对自发性高血压大鼠、血管紧张素Ⅱ诱导的高血压大鼠模型和环孢菌素A诱导的高血压大鼠模型等均具有明显的降压作用[14-16]。AMP依赖的蛋白激酶（adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase，AMPK）是生物能量代谢调节的关键分子，AMPK对血压调控有重要作用，激活SIRT1/AMPK可以降低血压[17-18]。课题组前期研究表明香烟烟雾颗粒（DSP）上调内皮素受体和肾上腺素α1受体诱导血管平滑肌收缩[19-20]，然而，其调节5-HT受体的作用及其机制还不十分清楚。因此，本实验采用离体动脉培养模型和大鼠被动吸烟模型，研究香烟烟雾和白藜芦醇调节5-HT介导的收缩反应及其机制，为吸烟相关心血管疾病的预防和治疗提供新的思路与依据。

1 材料

1.1 实验动物

SD大鼠，SPF级雄性，体质量200～250 g，6～8周龄[成都达硕实验动物有限公司，实验动物许可证号：SCXK（川）2020-030]，大鼠自由饮食饮水。

1.2 试药

5-HT（Sigma-Aldrich，批号：SLCF8396），AMPK通路激活剂AICAR（Med Chem Express，批号：13417），白藜芦醇（纯度≥98%，上海源叶，批号：R19J12S138196），5HT_{1B}受体抗体（Abcam，批号：ab52025），p-AMPK抗体（CST，批号：2535S），AMPK抗体（CST，批号：2532S），SIRT1抗体（批号：13161-1-AP）、GAPDH抗体（批号：60004-1-Ig）（Proteintech）。

1.3 仪器

DMT 630M离体微血管张力测定系统（丹麦DMT公司）；HF240 CO_2培养箱（力新仪器上海有限公司）；动物无创血压测量系统（CODA8，美国Kent公司）；化学发光系统（英国Gene公司）。

2 方法

2.1 DSP的制备

采用先前的研究方法，将3支燃烧的香烟在负压条件下通过吸滤器及脱脂棉球，脱脂棉球充分吸收烟雾颗粒后将其充分溶解在1 mL DMSO中，过滤除菌，即得DSP[19-20]。

2.2 肠系膜动脉环培养

分离SD大鼠肠系膜动脉，0.1% Triton X-100去除肠系膜动脉内皮，去除内皮的动脉剪成约2 mm的动脉环，将动脉环置于每孔含1 mL DMEM高糖培养基的24孔培养板中，为了研究不同浓度DSP对5-HT受体激动剂诱导血管收缩的影响，将肠系膜动脉血管在含不同质量浓度DSP（0.1、0.2、0.4 μL·mL^{-1}）的DMEM液中培养24 h，梯度累加法加入5-HT；为了研究不同时间对DSP诱导血管收缩的影响，将肠系膜动脉在含DSP 0.2 μL·mL^{-1}的DMEM液中培养不同的时间（0、12、24、48 h），离体肌张力描记技术比较每组血管收缩程度；为了研究SIRT1通路激活剂白藜芦醇及AMPK通路激活剂AICAR对5-HT介导的收缩反应的影响，0.2 μL·mL^{-1}的DSP和SIRT1通路激活剂（100 μmol·L^{-1}）或AMPK通路激活剂AICAR（10 μmol·L^{-1}）共培养24 h，等体积溶剂DMSO为对照。

2.3 大鼠被动吸烟模型

32只SD大鼠随机分为4组：正常对照（Control）组；香烟烟雾暴露（cigarette smoke exposure，CSE）组；CSE＋白藜芦醇小剂量（RSV 75 mg·kg^{-1}）组；CSE＋白藜芦醇大剂量（RSV 150 mg·kg^{-1}）组，香烟烟雾暴露采用先前的研究方法，将大鼠置于吸烟室中，每次被动吸烟5支，持续2 h，每日2次，

持续 8 周，正常对照组暴露在新鲜空气中[21]。大鼠吸烟 4 周后，使用白藜芦醇 75 mg • kg^{-1} 和 150 mg • kg^{-1} 进行灌胃给药，每日 1 次，连续 4 周。

2.4　大鼠无创血压测量

第 8 周采用 CODA 无创血压仪测量系统记录大鼠尾动脉收缩压和舒张压。

2.5　离体肌张力描记

恒温离体浴槽内加入 5 mL Na^+-PSS 溶液，将大鼠动脉环穿入 2 根 40 μm 的金属丝固定于浴槽内。固定好的动脉环平衡 40 min 后加入 60 mmol • L^{-1} K^+-PSS 溶液检验动脉环收缩活性，内皮依赖性舒张因子乙酰胆碱检测内皮是否去除完全，采用梯度累加法加入 5-HT 受体激动剂 5-HT（1×10^{-8} ～ 1×10^{-4} mol•L^{-1}），记录 5-HT 诱导的收缩曲线。

2.6　Western blot 法检测相关蛋白

动脉组织使用 RIPA 裂解液低温匀浆，提取总蛋白，蛋白经电泳后转至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，一抗 4 ℃过夜，二抗室温孵育 1 h，ECL 发光试剂显影，化学发光成像系统进行拍照，检测目标条带的光密度值，分析相关蛋白表达。

2.7　统计学分析

所有数据用均数 ± 标准差表示。采用单因素方差分析（ANOVA）和 Dunnett-*t* 检验进行多组数据间的比较，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　DSP 对 5-HT 介导的收缩反应的影响

图 1 结果表明，与溶剂对照 DMSO 相比，0.2 和 0.4 μL • mL^{-1} 的 DSP 可以明显增强 5-HT 的收缩作用（$P<0.05$，$P<0.01$）；与 0 h 相比，培养 12 h 和 24 h 血管收缩作用显著增强，与 0 h E_{max}（163.6±17.1）% 相比，DSP 培养 12 h 和 24 h E_{max} 为（213.7±24.5）% 和（298.9±30.9）%（$P<0.05$，$P<0.01$）。结果表明，0.2 μL • mL^{-1} 和 0.4 μL • mL^{-1} DSP 均可以显著增强 5-HT 诱导的收缩反应，0.2 μL • mL^{-1} DSP 培养 12 h 和 24 h 均可增强 -HT 诱导的收缩反应，培养 24 h 收缩反应最强。因此后续实验 DSP 浓度选择为 0.2 μL • mL^{-1}，培养时间为 24 h。

3.2　SIRT1 通路激活剂白藜芦醇对 5-HT 介导的收缩反应的影响

0.2 μL • mL^{-1} 的 DSP 和 AMPK 通路激活剂白藜芦醇（100 μmol • L^{-1}）共培养 24 h，与 DSP 组相比，白藜芦醇可以显著降低 5-HT 诱导

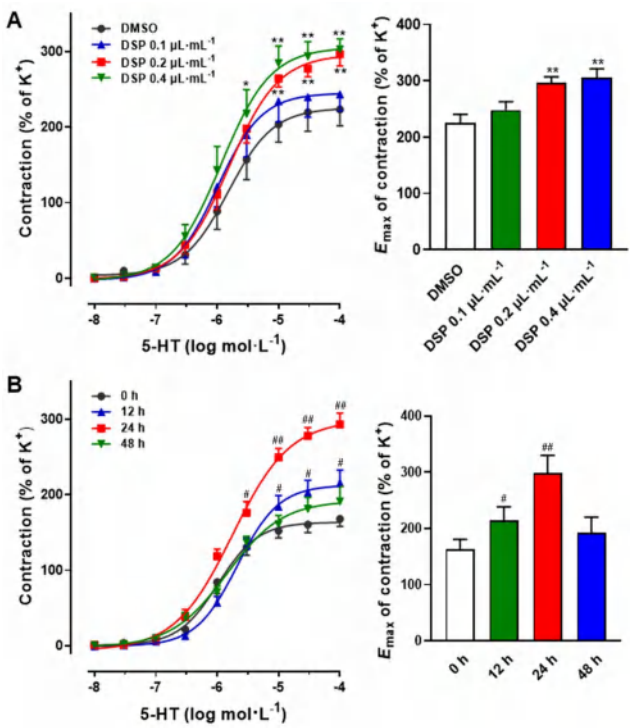


图 1　DSP 对 5-HT 介导的浓度 - 收缩曲线（A）和时间 - 收缩曲线（B）的影响

Fig 1　Effect of DSP on concentration-contractile curve（A）and time-contractile curve（B）mediated by 5-HT

注（Note）：与 DMSO 组相比，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 0 h 相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$（*vs* the DMSO group，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$；*vs* the 0 h，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$）。

的收缩反应，白藜芦醇 E_{max} 从（294.4±37.3）% 降低为（147.3±22.5）%（$P<0.01$）（见图 2）。Western blot 法检测结果表明，DSP 组 5-HT_{1B} 受体表达升高，SIRT1 蛋白表达降低，而 DSP + RSV 组 5-HT_{1B} 受体蛋白降低，SIRT1 蛋白表达升高。结果表明白藜芦醇显著降低 DSP 诱导的血管收缩反应（见图 3）。

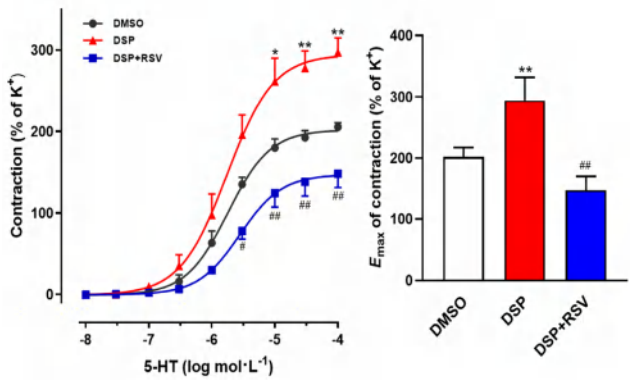


图 2　白藜芦醇对 5-HT 介导收缩的影响

Fig 2　Effect of RSV on 5-HT induced contraction

注（Note）：与 DMSO 组相比，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 DSP 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$（*vs* the DMSO group，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$；*vs* the DSP group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$）。

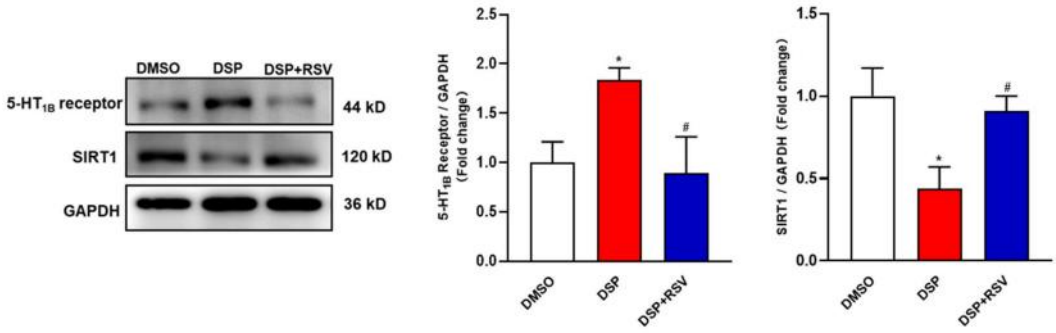


图 3 RES 对 5-HT_{1B} 受体和 SIRT1 蛋白的表达的影响

Fig 3 Effect of RES on the protein expression of 5-HT1B receptor and SIRT1

注（Note）：与 DMSO 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DSP 组相比，$^{\#}P < 0.05$（*vs* the DMSO group，$^{*}P < 0.05$；*vs* the DSP group，$^{\#}P < 0.05$）。

3.3 AMPK 通路激活剂 AICAR 对 5-HT 介导的收缩反应的影响

0.2 μL·mL^{-1} 的 DSP 和 AMPK 通路激活剂 AICAR（10 μmol·L^{-1}）共培养 24 h，结果表明，与 DSP 组相比，AICAR 可以显著降低 5-HT 诱导的收缩反应，AICAR E_{max} 从（288.3±34.0）%降低为（230.6±36.9）%（$P < 0.05$）（见图 4）。Western blot 检测结果表明，DSP 组 5-HT_{1B} 受体表达升高，p-AMPK*α*/AMPK*α* 蛋白表达降低，而 DSP＋AICAR 组 5-HT_{1B} 受体蛋白降低，p-AMPK*α*/AMPK*α* 蛋白表达升高。结果表明 AMPK 通路激活剂 AICAR 显著降低 DSP 诱导的血管收缩反应（见图 5）。

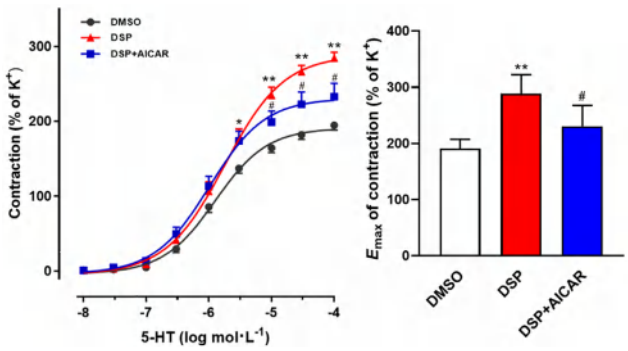


图 4 AICAR 对 5-HT 介导收缩的影响。

Fig 4 Effect of AICAR on 5-HT induced contraction

注（Note）：与 DMSO 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DSP 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（*vs* the DMSO group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the DSP group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

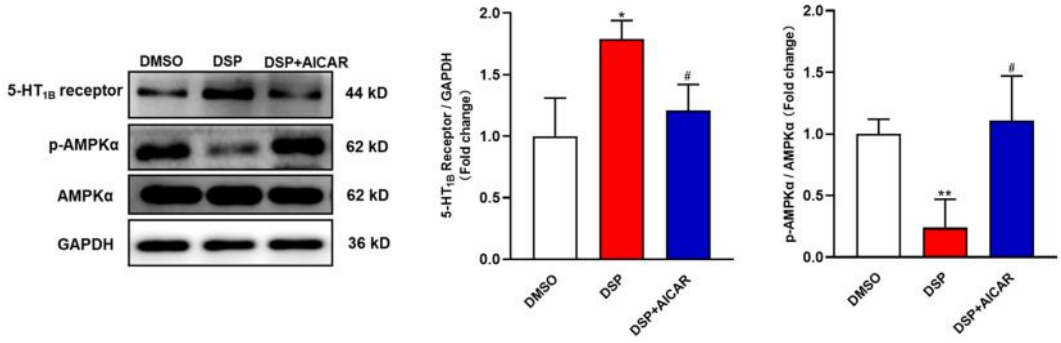


图 5 AICAR 对 5-HT_{1B} 受体和 p-AMPK*α*/AMPK*α* 蛋白的表达的影响

Fig 5 Effect of AICAR on protein expression of 5-HT_{1B} receptors and p-AMPK*α*/AMPK*α*

注（Note）：与 DMSO 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DSP 组相比，$^{\#}P < 0.05$（*vs* the DMSO group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the DSP group，$^{\#}P < 0.05$）。

3.4 SIRT1 通路激活剂白藜芦醇对被动吸烟大鼠血压的影响

SD 大鼠经烟雾暴露 8 周后，与正常对照组相比，CSE 组大鼠收缩压和舒张压均明显升高（$P < 0.05$），表明烟雾暴露可以引起大鼠血压升高，而白藜芦醇大剂量组大鼠收缩压和舒张压均明显降低，表明白藜芦醇可以显著降低大鼠烟雾暴露引起的血压升高（见图 6）。

3.5 白藜芦醇对动吸烟大鼠肠系膜动脉收缩的影响

与正常对照组相比，CSE 组明显增强了 5-HT 介导的收缩反应，白藜芦醇大剂量组显著降低了收缩反应（见图 7）。Western blot 检测结果表明，CSE 组 5-HT_{1B} 受体蛋白表达显著升高，SIRT1 和 p-AMPK*α*/AMPK*α* 蛋白表达降低，而 RSV 组 5-HT_{1B} 受体蛋白表达降低，SIRT1 和 p-AMPK*α*/AMPK*α* 蛋白表达升高（见图 8）。

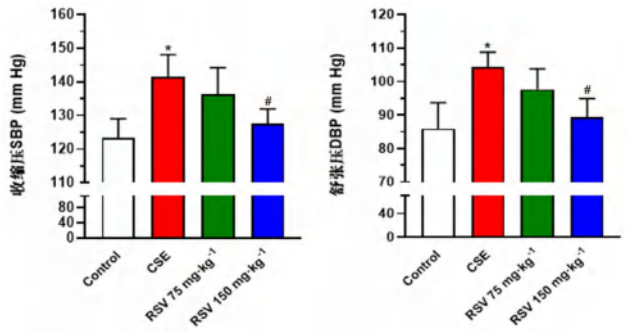


图 6　白藜芦醇对被动吸烟大鼠血压的影响

Fig 6　Effect of AICAR on 5-HT induced contraction

注（Note）：与正常对照组相比，$^{*}P < 0.05$；与 CSE 组相比，$^{\#}P < 0.05$（*vs* the normal control group，$^{*}P < 0.05$；*vs* the CSE group，$^{\#}P < 0.05$）。

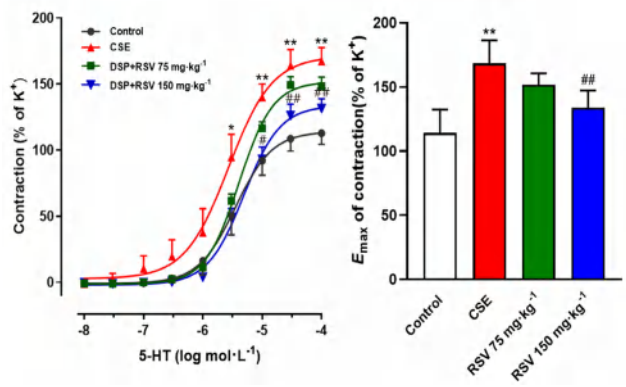


图 7　白藜芦醇对 5-HT 介导收缩的影响

Fig 7　Effect of RSV on 5-HT induced contraction

注（Note）：与正常对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 CSE 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（*vs* the normal control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the CSE group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

4　讨论

吸烟严重危害人类的健康，吸烟与动脉收缩反应增强密切相关，然而吸烟导致动脉收缩及高血压的分子机制尚不清楚[22-23]。本研究采用离体动脉血管培养技术和动物体内实验从大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩功能和相关蛋白表达研究了香烟烟雾上调 5-HT_{1B} 受体介导的血管收缩反应。研究结果表明香烟烟雾可升高大鼠血压，体外和体内研究均表明香烟烟雾显著增强肠系膜动脉平滑肌的 5-HT_{1B} 受体介导的收缩反应，而白藜芦醇可以降低香烟烟雾诱导的血压升高，并且抑制 5-HT 引起的血管收缩增强和减少 5-HT_{1B} 蛋白的表达，白藜芦醇可以显著降低香烟烟雾引起的血压升高和血管收缩。

5-HT 在血管痉挛中起重要作用，高血压患者对 5-HT 的反应性明显增高[24-25]，高血压大鼠肠系膜动脉 5-HT 受体的 mRNA 和蛋白质表达均明显增加[26]。本研究结果表明，DSP 诱导 5-HT 引起的血管收缩作用呈明显的浓度依赖性和时间依赖性，香烟烟雾暴露使 5-HT 引起的血管收缩作用明显增强，DSP 和香烟烟雾暴露均使 5-HT_{1B} 受体的表达增加，表明香烟烟雾引起的血压升高和血管收缩可能与 5-HT_{1B} 受体有关。使用 SIRT1 通路激活剂白藜芦醇与 DSP 共同培养 24 h，DSP 升高 5-HT_{1B} 受体表达，降低 SIRT1 蛋白表达，白藜芦醇可以明显抑制 5-HT 诱导的收缩反应，降低 5-HT_{1B} 受体表达，升高 SIRT1 蛋白表达。AMPK 的激活具有保护心血管的作用，AICAR 可以显著的抑制 DSP 诱导的收缩反应，降低 5-HT_{1B} 受体表达，升高 p-AMPK*α*/AMPK*α* 蛋白表达。香烟烟雾暴露 8 周显著升高大鼠的收缩压和舒张压，白藜芦醇给药 4 周可以明显降低香烟烟雾暴露大鼠的血压，降低 5-HT 介导的收缩反应和 5-HT_{1B} 受体的表达，升高 SIRT1 蛋白和 p-AMPK/AMPK*α* 蛋白的表达。

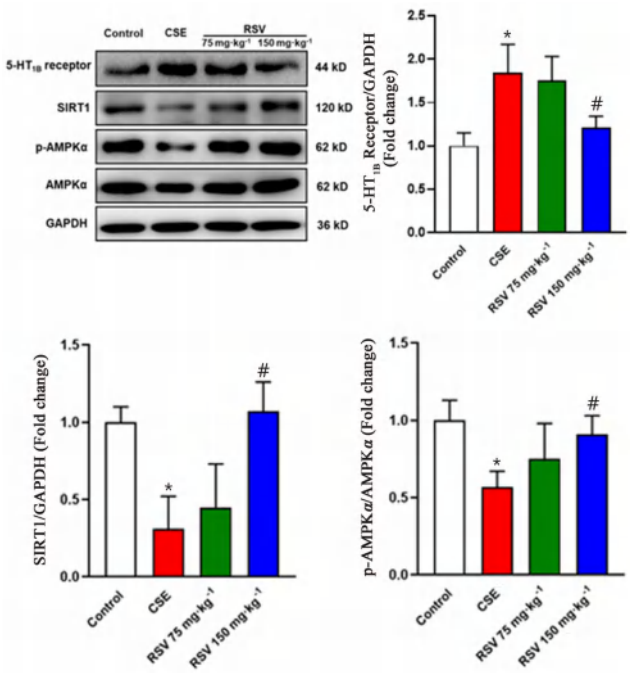


图 8　RSV 对 5-HT_{1B} 受体，SIRT1 和 p-AMPK*α*/AMPK*α* 蛋白的表达的影响

Fig 8　Effect of RSV on protein expression of 5-HT_{1B} receptor，SIRT1 and p-AMPK*α*/AMPK*α*

注（Note）：与正常对照组相比，$^{*}P < 0.05$；与 CSE 组相比，$^{\#}P < 0.05$（*vs* the normal control group，$^{*}P < 0.05$；*vs* the CSE group，$^{\#}P < 0.05$）。

综上所述，本研究发现香烟烟雾可以引起大鼠肠系膜动脉收缩和血压升高，白藜芦醇可以改善香烟烟雾诱导的血压升高，改善血管的收缩功能障碍，为治疗高血压等心血管疾病提供实验依据。

参考文献

[1] Schumacher M，Rucker G，Schwarzer G. Meta-analysis and the Surgeon General’s report on smoking and health [J]. N Engl J Med，2014，370（2）：186-188.

[2] 王辰，肖丹，池慧 .《中国吸烟危害健康报告 2020》概要 [J]. 中国循环杂志，2021，36（10）：937-952.

[3] Smith CJ，Hansch C. The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate [J]. Food Chem Toxicol，2000，38（7）：637-646.

[4] Whitehead AK，Erwin AP，Yue X. Nicotine and vascular dysfunction [J]. Acta Physiol（Oxf），2021，231（4）：e13631.

[5] Münzel T，Hahad O，Kuntic M，et al. Effects of tobacco cigarettes，e-cigarettes，and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes [J]. Eur Heart J，2020，41（41）：4057-4070.

[6] Halperin RO，Gaziano JM，Sesso HD. Smoking and the risk of incident hypertension in middle-aged and older men [J]. Am J Hypertens，2008，21（2）：148-152.

[7] Vikenes K，Farstad M，Nordrehaug JE. Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events [J]. Circulation，1999，100（5）：483-489.

[8] Kaumann AJ，Levy FO. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system [J]. Pharmacol Ther，2006，111（3）：674-706.

[9] Gamoh S，Hisa H，Yamamoto R. 5-hydroxytryptamine receptors as targets for drug therapies of vascular-related diseases [J]. Biol Pharm Bull，2013，36（9）：1410-1415.

[10] 陈宗泽，廉姜芳 . 沉默信息调节因子 2 相关酶类 1/ 核因子 E2 相关因子 2 信号通路在高血压病中的抗氧化应激作用 [J]. 中国循环杂志，2018，33（10）：1035-1037.

[11] 王川，王钰莹，王婷，等 . 基于 SIRT1-ERK1/2 通路研究白藜芦醇对环孢菌素 A 诱导高血压的作用及机制 [J]. 中草药，2022，53（9）：2723-2730.

[12] Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and cardiovascular diseases [J]. Nutrients，2016，8（5）：250.

[13] Prysyazhna O，Wolhuter K，Switzer C，et al. Blood pressure-lowering by the antioxidant resveratrol is counterintuitively mediated by oxidation of cGMP-dependent protein kinase [J]. Circulation，2019，140（12）：126-137.

[14] Xia N，Daiber A，Förstermann U，et al. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system [J]. Br J Pharmacol，2017，174（12）：1633-1646.

[15] Javkhedkar AA，Quiroz Y，Rodriguez-Iturbe B，et al. Resveratrol restored Nrf2 function，reduced renal inflammation，and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol，2015，308（10）：840-846.

[16] Cao X，Luo T，Luo X，et al. Resveratrol prevents AngII-induced hypertension via AMPK activation and RhoA/ROCK suppression in mice [J]. Hypertens Res，2014，37（9）：803-810.

[17] Carling D. AMPK signalling in health and disease [J]. Curr Opin Cell Biol，2017，45：31-37.

[18] Herzig S，Shaw RJ. AMPK：guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2018，19（2）：121-135.

[19] 许梦荣，王川，路鹏鹏，等 . 香烟烟雾颗粒通过 ERK1/2 信号通路上调肾上腺素 α_1 受体诱导血管平滑肌收缩 [J]. 中南药学，2021，19（5）：831-835.

[20] 张盼，王钰莹，王婷，等 . 香烟烟雾颗粒通过 MAPK 和 NF-κB 信号通路上调内皮素受体诱导大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1238-1244.

[21] Cao L，Lindstedt I，Edvinsson ML，et al. Secondhand cigarette smoke induces increased expression of contractile endothelin receptors in rat coronary arteries via a MEK1/2 sensitive mechanism [J]. Scand Cardiovasc J，2021，55（1）：50-55.

[22] Xu CB，Sun Y，Edvinsson L. Cardiovascular risk factors regulate the expression of vascular endothelin receptors [J]. Pharmacol Ther，2010，127（2）：148-155.

[23] 徐仓宝，张亚萍 . 内皮素受体表达上调在冠状动脉痉挛中的作用机制 [J]. 中国动脉硬化杂志，2015，23（1）：1-4.

[24] Bampalis VG，Khandoga AL，Siess W. Fluoxetine inhibition of 5-HT-potentiated platelet aggregation in whole blood [J]. Thromb Haemost，2010，104（6）：41272-1274.

[25] 明康文，洪创雄 . 调平康片对伴焦虑症状高血压患者血浆 5-HT、NE 影响的研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2011，13（6）：80-81.

[26] Wang H，Gao XY，Rao F，et al. Mechanism of contractile dysfunction induced by serotonin in coronary artery in spontaneously hypertensive rats [J]. N-S Arch Pharmacol，2020，393：2165-2176.

[27] Lee J. Use of antioxidants to prevent cyclosporine a toxicity [J]. Toxicol Res，2010，26（3）：163-170.

（收稿日期：2023-02-15；修回日期：2023-05-16）

金嗓散结丸体外溶出行为的研究

汪海宣，程庆兵，郑正，许倩，刘静，陶俊钰*（合肥市食品药品检验中心，合肥　230088）

摘要：目的　建立金嗓散结丸体外溶出测定方法，并对其溶出情况进行评价。**方法**　采用桨法，分别以水、0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液、人工胃液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质，体积 1000 mL，转速 100 r • min^{-1}。采用 HPLC 测定金嗓散结丸中 2 种成分的累积溶出量。绘制溶出曲线图，以人工胃液为参比，采用相似因子（f_2）法进行溶出度比较。采用不同的数据模型对溶出数据进行模型拟合，确定金嗓散结丸的最佳溶出模型。**结果**　在人工胃液和 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液中，不同批次的金嗓散结丸 2 种指标成分溶出行为差异性较小，120 min 溶出达到平衡，同一样品 2 种指标成分的溶出呈现同步性。在水和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中绿原酸和黄芩苷溶出量较低。在水中，其溶出行为存在显著性差异。各批次金嗓散结丸 2 种指标成分的溶出数据拟合结果略有不同，主要以 Weibull 方程的数据模型最佳。**结论**　金嗓散结丸在 0.1 mol • L^{-1} 盐酸中更有利于其指标成分的溶出，偏碱性溶液对指标成分的溶出影响较大。该研究准确可靠，可用于金嗓散结丸的质量控制，同时也为其质量一致性评价研究及工艺的分析改进提供了数据支撑。

关键词：金嗓散结丸；溶出行为；HPLC；溶出曲线；相似因子
中图分类号：R283.6，TQ461　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1781-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.015

Dissolution behaviors of Jinsang Sanjie pills

WANG Hai-xuan, CHENG Qing-bing, ZHENG Zheng, XU Qian, LIU Jing, TAO Jun-yu* (*Hefei Center for Food and Drug Control*, *Hefei*　230088)

Abstract: Objective　To determine and evaluate the in vitro dissolution of Jinsang Sanjie pills. **Methods**　Water, 0.1 mol • L^{-1} hydrochloric acid solution, artificial gastric juice and pH 6.8 phosphate buffer were used as the dissolution media by paddle method with a volume of 1000 mL and a rotation speed of 100 r • min^{-1}. The cumulative dissolution of the two components in Jinsang Sanjie pills was determined by HPLC. The dissolution curve was obtained, and the dissolution degree was compared by f_2 similarity factor method with the artificial gastric juice as the reference. Different data models were used to fit the dissolution data to determine the optimal dissolution model of Jinsang Sanjie pills. **Results**　There was limited difference in the dissolution behavior of the two index components in different batches of Jinsang Sanjie pills in both the artificial gastric juice and 0.1 mol • L^{-1} hydrochloric acid solution. The dissolution reached equilibrium within 120 min. The two index components in the same sample showed synchronized dissolution. Lower amounts of chlorogenic acid and baicalin were dissolved in water and pH 6.8 phosphate buffer. In water, the dissolution behavior was significantly different. The fitting of dissolution data of each batch of Jinsang Sanjie pills was slightly different, and Weibull model was the best. **Conclusion**　Jinsang Sanjie pills is dissolve better in 0.1 mol • L^{-1} hydrochloric acid. Alkaline solution has a greater effect on the dissolution of the index components. This method is accurate and reliable, which can be used fo the quality control of Jinsang Sanjie pills, and provide data support for the quality consistency evaluation and process analysis improvement.

Key words: Jinsang Sanjie pill; dissolution behavior; HPLC; dissolution curve; similarity factor

基金项目：安徽省药品监督管理局科技创新项目（编号：AHYJ-KJ-202122）。
作者简介：汪海宣，男，副主任药师，主要从事药品检验与质量分析，email：114373238@qq.com　*通信作者：陶俊钰，女，主任药师，主要从事药品检验与质量分析，email：942884082@qq.com

丸剂是我国的传统剂型，是由中药材细粉末，或者中药材的提取物混合适宜的黏合剂或其他辅料制备而成的球形或类球形的制剂。而依据其所含赋形剂的不同，又可将丸剂分为水丸、蜜丸、水蜜丸、浓缩丸、糊丸、蜡丸[1]。金嗓散结丸是由马勃、莪术（醋炒）、金银花、黄芩、玄参、丹参、板蓝根、蒲公英等 16 味中药提取制成的棕黑色的水蜜丸，具有清热解毒、活血化瘀、利湿化痰的功效。常用于热毒蕴结、气滞血瘀所致的声音嘶哑、声带充血、肿胀；慢性喉炎、声带小结、声带息肉见上述证候者[2]。收载于《中国药典》2020 年版一部[2]。目前，金嗓散结丸的相关研究主要集中于含量测定[3]和临床研究[4-9]等方面，关于其体外释放和溶出行为未见相关报道。为全面研究比较金嗓散结丸的体外释放和溶出行为，考察其生物利用度，本研究考察了金嗓散结丸相关成分的含量测定和溶出度的测定方法[10]。并依据国家药品监督管理局颁布的《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》[11]，分别考察处方中金银花和黄芩的主要成分绿原酸[12-13]和黄芩苷[14-15]的累计溶出量，考察不同批次在 4 种溶出介质中的溶出行为，并以人工胃液为参比，对溶出曲线进行比较，拟合不同模型的溶出方程并进行评价，为金嗓散结丸的质量评价提供一定的数据参考。

1 材料

1.1 试药

金嗓散结丸（西安碑林药业股份有限公司，批号：WA121030543、WA121040643、WA121040663、WA121040703、WA121040792、WA121040802）均为市售品；黄芩苷（批号：110715-202122，纯度：94.2%）、绿原酸（批号：110753-202119，纯度：96.3%）（中国食品药品检定研究院）；甲醇、乙腈（色谱纯，美国 Fisher 公司）；盐酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸、胃蛋白酶为分析纯，人工胃液为自制（取稀盐酸 16.4 mL，加水 800 mL 与胃蛋白酶 10 g，摇匀后，加水稀释至 1000 mL），色谱用水为超纯水机制备，试验用纯化水为自制。

1.2 仪器

XPE-205 型分析用电子天平（瑞士梅特勒托利多科技有限公司）；自动在线溶出度液相联用系统（AOD-LC3100）：由 UDT-812A-12 型溶出仪（美国 LOGAN 公司）、WY 3100 型高效液相色谱仪（安徽皖仪科技有限公司）和液相溶出联用平台组成；Milli-Q 超纯水机（美国 Millipore）。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取绿原酸对照品和黄芩苷对照品适量，分别置 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，即得 1.018 mg·mL^{-1}、1.012 mg·mL^{-1} 的对照品储备液。分别精密量取上述对照品储备液适量置同一量瓶中，分别加甲醇依次稀释制成分别含绿原酸 2.036、4.072、6.108、10.018、16.126 μg·mL^{-1}，含黄芩苷 0.506、1.013、2.027、4.054、8.108 μg·mL^{-1} 的溶液，作为标准曲线用对照品溶液。分别取绿原酸和黄芩苷对照品储备液 2 mL 置同一 100 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，作为重复性试验用对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取水、0.1 mol·L^{-1} 盐酸溶液、人工胃液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质，按《中国药典》2020 年版四部通则 0931 溶出度与释放度测定法第二法（桨法）操作，转速为 100 r·min^{-1}，温度为 37.0 ℃；取金嗓散结丸 10 粒，每种溶出介质 6 份，精密称定后投入溶出杯中，同时启动自动在线溶出度液相联用系统，分别在 10、20、30、45、60、90、120、180 min 取样测试分析，每次取样 1 mL，同时补充同等温度和体积的溶出介质。

2.1.3 含量测定溶液[2] 取金嗓散结丸（批号：WA121030543）100 粒，精密称定，求得平均粒重，研细，精密称取粉末约 1 g，置具塞棕色三角瓶中，精密加入 50% 甲醇 25 mL，称定重量，超声（功率 1000 W，频率 50 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用 50% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液。

2.2 色谱条件

色谱注：phenomenex Luna C18（2）(250 mm×4.6 mm，5 μm）；以 0.2% 磷酸溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B，进行梯度洗脱（0 ～ 10 min，95%A；10 ～ 70 min，95% → 60%A，70 ～ 71 min，60% → 95%A，71 ～ 80 min，95%A）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；柱温为 30 ℃；进样量为 20 μL；检测波长为 330 nm。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 取 50% 甲醇溶液作为空白溶液，另取混合对照品溶液，含量测定溶液，均按“2.2”项下方法测定。空白溶液色谱图中 2 种成分相应保留时间处无色谱峰出现，辅料及溶剂对测定无干扰。色谱图见图 1。

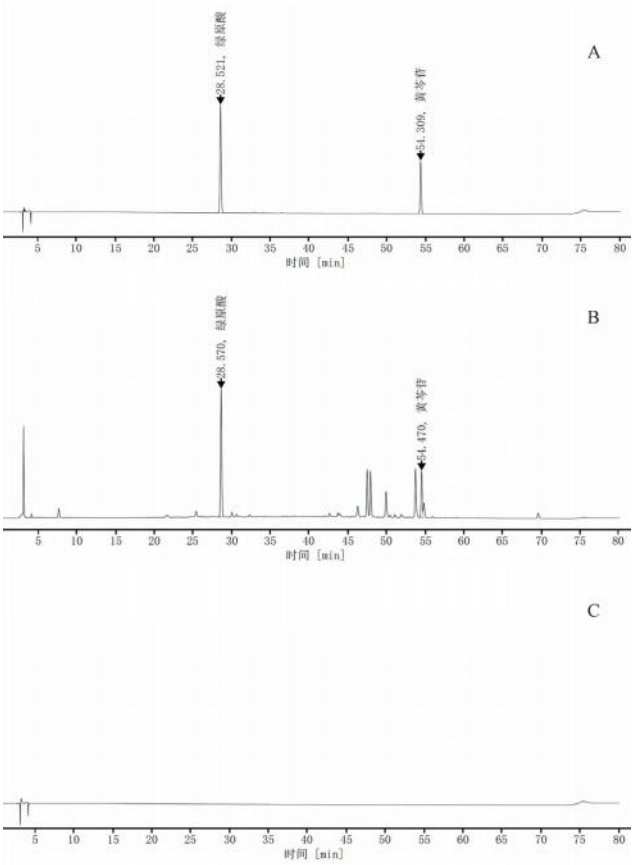


图 1 混合对照品（A）、含量测定溶液（B）及空白溶液（C）的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed reference（A）, content determination solution（B）, and blank solution（C）

2.3.2 线性关系、检测限和定量限 取“2.1.1”项下标准曲线用对照品溶液，进样测定，以质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标，对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线，得到绿原酸和黄芩苷的回归方程分别为 $y = 17.42x - 3.012$（$r = 0.9997$）、$y = 55.34x + 4.507$（$r = 0.9994$），绿原酸和黄芩苷分别在 2.036 ～ 16.126 μg • mL^{-1}、0.506 ～ 8.108 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系。另取混合对照品溶液适量，用甲醇稀释至适当浓度，当信噪比（*S/N*）为 3∶1 时测得黄芩苷和绿原酸检测限分别为 4.88、4.91 ng，定量限分别为 14.86、17.12 ng。

2.3.3 精密度试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液，连续进样分析 6 次，结果黄芩苷峰面积的 *RSD* 为 0.080%，绿原酸的峰面积 *RSD* 为 0.070%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取金嗓散结丸（批号：WA121030543）6 份，按“2.1.2”项下方法制备，以 4 种溶出介质 120 min 取样的溶液作为供试品溶液，进样测定，记录 4 种溶出介质中黄芩苷和绿原酸的峰面积并计算溶出度，其溶出度 *RSD* 均小于 5.0%，表明该方法的重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取“2.1.2”项下的 4 种溶出介质的供试品各 1 份，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定分析，计算得出每种溶出介质中黄芩苷和绿原酸峰面积，结果其峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明供试品在 24 h 内稳定。

2.3.6 加样回收试验 精密称取已知绿原酸和黄芩苷含量的金嗓散结丸（批号：WA121030543）粉末 6 份，每份约 0.25 g，分别置 50 mL 量瓶中，每份分别加入绿原酸对照品储备液 1.0 mL 和黄芩苷对照品储备液 0.5 mL，加 50% 甲醇超声 30 min，放冷，加 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀。每份分别精密量取 4 组 5 mL 分别置 25 mL 量瓶中，分别用水、0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液、人工胃液和 pH 6.8 磷酸盐溶液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液进样分析，计算回收率及 *RSD*，绿原酸和黄芩苷的平均回收率分别为 97.6%、98.4%，*RSD* 分别为 0.90%、1.2%，表明该方法准确度良好。

2.3.7 含量的测定 取“2.1.3”项下样品溶液，进样测定，分别计算 6 批样品中的绿原酸和黄芩苷的含量，结果见表 1。

表 1 绿原酸和黄芩苷的含量测定结果（$n = 2$，mg • g^{-1}）

Tab 1 Content of chlorogenic acid and baicalin（$n = 2$，mg • g^{-1}）

批号	绿原酸	黄芩苷
WA121030543	7.83	1.85
WA121040643	7.76	1.80
WA121040663	7.78	1.65
WA121040703	7.81	1.88
WA121040792	7.68	1.68
WA121040802	7.72	1.74

2.4 溶出行为曲线的绘制与评价

2.4.1 溶出行为曲线的测绘制 依据《指导原则》按“2.1”和“2.2”项下方法制备供试品溶液并测试分析，根据“2.3.6”项下各批次中的绿原酸和黄芩苷的含量，计算出各时间段的累计溶出量。以溶出时间（min）为横坐标，目标成分累计溶出量（%）为纵坐标，绘制 2 种成分的溶出曲线，见图 2 ～ 3。

2.4.2 溶出曲线评价 参照相关文献[16]及《指导原则》，以人工胃液为溶出介质的溶出样品为参比样品，采用非模型依赖相似因子（f_2）分别对各溶出行为进行评价，f_2 的计算公式：

$$f_2 = 100/\left(F\sqrt{1 + 1/n\sigma_{t=1}^{n}\left(R_t - T_t\right)^2}\right)$$

其中 R_t 为参比样品在 t 时间内的累计溶出量，T_t 为试验样品在 t 时间内的累计溶出量，本次研究对选取的 8 个时间点（10、20、30、45、60、

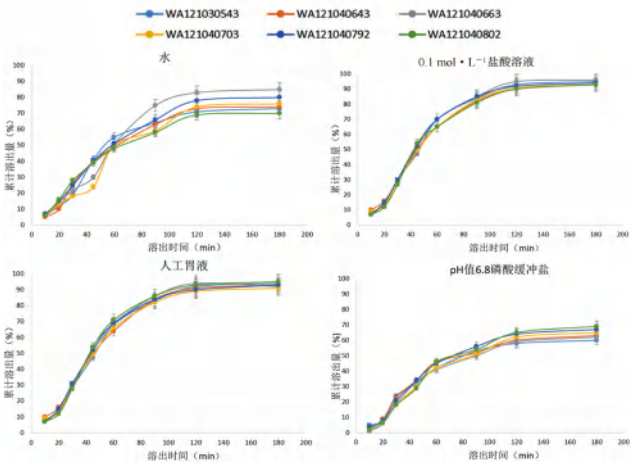


图 2 金嗓散结丸中绿原酸在 4 种溶出介质中的溶出曲线

Fig 2 Dissolution curve of chlorogenic acid in Jinsang Sanjie pills in 4 dissolution media

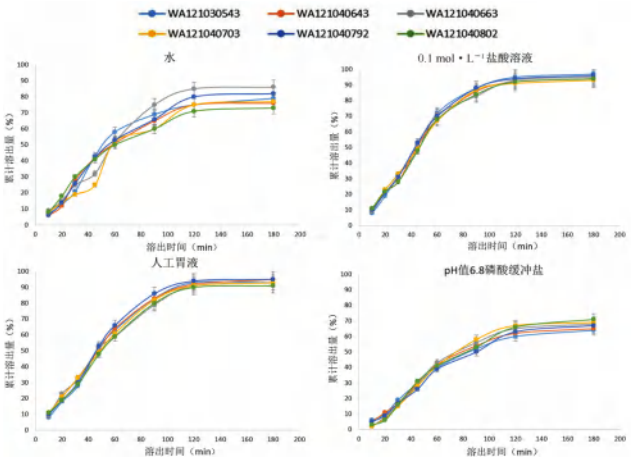


图 3 金嗓散结丸中黄芩苷在 4 种溶出介质中的溶出曲线

Fig 3 Dissolution curve of baicalin in Jinsang Sanjie pill in 4 dissolution media

90、120、180 min）进行溶出曲线拟合并评价，结果见表 2 ～ 3。试验表明样品在 0.1 mol • L^{-1} 盐酸中的溶出度较好，且 6 批次的溶出行为相似，在水和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的溶出行为差异相对较大。

2.5 溶出模型拟合

以批号为 WA121030543 的样品作进一步研究，采用模型依赖法零级释放方程 $F = k_0(t - Tlag)$、一级释放方程 $F = 100\{1 - Exp[-(t - Ti)^{\beta}/\alpha]\}$、Weibull 方程 $F = 100\{1 - Exp[-(t - Ti)^{\beta}/\alpha]\}$、Higuchi with Tlag 方程 $F = kH(t - Tlag)^{0.5}$、Korsmeyer-Peppas with Tlag 方程 $F = kKP(t - Tlag)^{n}$、Quadratic with Tlag 方程 $F = k_1(t - Tlag)^{0.5} + k_2(t - Tlag)$ 分别对目标成分绿原酸和黄芩苷在 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液中释放行为进行拟合，结果见表 4，各指标的拟合数据稍有差异，但是各拟合的趋势基本一致，主要以 Weibull 方程的数据模型最佳。

表 2 不同溶出介质间目标成分相似因子比较

Tab 2 Indicator f_2 of different dissolution media

溶出介质	绿原酸	黄芩苷
0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液	97.55	74.79
水	42.82	47.03
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	32.99	33.78

表 3 不同批次间目标成分相似因子比较

Tab 3 Indicator f_2 of different batches

批次	绿原酸	黄芩苷
WA121030543	97.55	74.79
WA121040643	96.42	76.18
WA121040663	96.17	75.64
WA121040703	97.12	74.95
WA121040792	95.88	74.15
WA121040802	94.92	76.22

3 讨论

由于金嗓散结丸为水蜜丸，处方组成较多，在 0.1 mol • L^{-1} 盐酸中溶出物质成分复杂，本次研究以金银花中的绿原酸和黄芩中的绿原酸为代表来评价其体外溶出情况，本方法中以乙腈 -0.2% 磷酸溶液为流动相，进行梯度洗脱并调节比例，最终绿原酸峰和黄芩苷峰与相邻峰达到良好的分离效果，分离度均大于 1.5，理论板数均大于 3000；考虑到水蜜丸的溶散特性，本次研究采用 75、100、120 r • min^{-1} 进行转速选择，结果发现在 75 r • min^{-1} 时部分样品溶散不完全，在 100 和 120 r • min^{-1} 时绿原酸和黄芩苷的溶出量无显著差异，且在溶出达到平衡时累计溶出量基本可达到 85% 以上。依据《指导原则》[11] 应当在适当、温和的试验条件下进行溶出度试验的要求，确定转速为 100 r • min^{-1}。

因绿原酸在碱性条件下不稳定，溶出介质在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液及人工肠液条件下，对绿原酸和黄芩苷体外释放无显著差异；以水为溶出介质时，目标成分溶出行为存在明显差异；以 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液和人工胃液中，不同批号的金嗓散结丸的 2 种指标成分溶出行为差异性较小，在 120 min 溶出达到平衡，2 种指标成分的溶出呈现同步性。

影响水蜜丸工艺的因素主要有不同药粉细度及不同烘干时间等 [1]。基于原辅料来源的不同，制剂有效成分的溶出过程将会因成型工艺、原辅料等因素而有所差异，对于药品的有效性及安全性均有一定的影响。目前代表药物生物等效性的评价试验主要采用溶出度检测和生物效价评价 [17]，为保证不同厂家及批次金嗓散结丸的生物

表 4　样品中 2 种目标成分在 0.1 mol・L^{-1} 盐酸溶液中释放模型拟合

Tab 4　Fitting of dissolution model of the two target components in the sample in 0.1 mol・L^{-1} hydrochloric acid solution

目标成分	模型	拟合方程	r
绿原酸	零级释放方程	$F = 0.537(t - 32.872)$	0.8954
	一级释放方程	$F = 100\{1 - \mathrm{Exp}[-0.02(t - 9.089)]\}$	0.9888
	Weibull 方程	$F = 100\{1 - \mathrm{Exp}[-(t - 4.676)^{1.321}/202.734]\}$	0.9962
	Higuchi with Tlag 方程	$F = 8.471(t - 14.433)^{0.5}$	0.9642
	Korsmeyer-Peppas with Tlag 方程	$F = 10.370(t - 11.228)^{0.46}$	0.9547
	Quadratic with Tlag 方程	$F = 0.000\,003\,3(t - 0.989)^{0.5} + 0.001(t - 0.989)$	0.9906
黄芩苷	零级释放方程	$F = 0.522(t - 39.583)$	0.9041
	一级释放方程	$F = 100\{1 - \mathrm{Exp}[-0.02(t - 7.297)]\}$	0.9899
	Weibull 方程	$F = 100\{1 - \mathrm{Exp}[-(t + 2.22)^{1.496}/505.511]\}$	0.9960
	Higuchi with Tlag 方程	$F = 8.294(t - 8.885)^{0.5}$	0.9653
	Korsmeyer-Peppas with Tlag 方程	$F = 9.912(t - 9.345)^{0.461}$	0.9661
	Quadratic with Tlag 方程	$F = -0.000\,05(t - 3.424)^{0.5} + 0.014(t - 3.424)$	0.9952

注（Note）：*F*. 累计溶出量（cumulative dissolution）；*t*. 累计溶出时间（cumulative dissolution time）。

等效性，本研究对金嗓散结丸中多种成分的溶出曲线进行研究，更加全面、客观、准确地反映了该制剂的体外溶出情况，为其质量控制、工艺改进及质量一致性评价提供数据支撑。

参考文献

[1] 毛雪，赵鑫，郭艳 . 蜜丸的制备工艺及质量标准研究 [J]. 检验医学与临床，2019，24（16）：3710-3712.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：1173-1174.

[3] 郭元春 . 反相高效液相色谱法测定金嗓散结丸中丹参酮ⅡA 的含量 [J]. 中国基层医药，2012，19（23）：3640-3641.

[4] 孙淑君 . 金嗓利咽丸联合金嗓散结丸治疗慢性咽喉炎的效果 [J]. 实用中医内科杂志，2021，35（5）：91-94.

[5] 姜永梅 . 金嗓散结丸对声带小结患者嗓音的影响 [J]. 临床医学研究与实践，2019，4（10）：144-145.

[6] 范军，张红燕 . 清咽利喉汤联合金嗓散结丸治疗中重度急性喉炎的临床研究 [J]. 中医药导报，2019，25（8）：85-88.

[7] 姜薇，谭建国 . 金嗓散结丸联合复方丹参片治疗慢性喉炎 60 例疗效观察 [J]. 现代医药卫生，2012，28（22）：106-107.

[8] 范绍翀，潘永，叶浩昕，等 . 金嗓散结丸治疗声带小结疗效分析 [J]. 大家健康，2012，6（10）：24-26.

[9] 栾岚，印有亮，韩雪娇 . 清喉利咽颗粒联合金嗓散结丸对声带息肉术后发声障碍患者嗓音恢复的影响 [J]. 当代医学，2021，27（8）：44-47.

[10] 闫伟伟，罗慧玉，刘秀燕，等 . 血塞通滴丸溶出行为研究 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（6）：777-782.

[11] 国家食品药品监督管理总局 . 普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则 [S]. 2015-02-05.

[12] 石雨荷，谢舒平，王丽君，等 . 高效液相色谱法同时测定湖南不同产地金银花中不同部位绿原酸与木犀草苷含量 [J]. 中南药学，2019，17（4）：552-555.

[13] 张浩，叶静，马长宏，等 . 不同产地金银花中酚酸类含量的测定 [J]. 人参研究，2022，34（5）：20-22.

[14] 郑敏敏，柳洁，赵清 . 药用植物黄芩的生物学研究进展及展望 [J]. 生物技术通报，2022，39（2）：2-10.

[15] 郑如文，刘港辉，江志强，等 . 黄芩 UPLC-DAD 指纹图谱的建立及其黄芩苷和汉黄芩苷的含量研究 [J]. 中南药学，2021，19（9）：1898-1903.

[16] Zhang Y，Huo MY，Zhou JP，et al. DDSolver：an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles [J]. AAPS J，2010，12（3）：263-271.

[17] 赵桉熠，倪凤燕，陈彭月，等 . 以一致性为核心的中成药质量研究现状及优质评价新模式探讨 [J]. 中国中药杂志，2020，45（15）：3740-3748.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-03-20）

基于网络药理学及实验验证探究益肾活血方治疗肾纤维化的作用机制

姚玲[1]，程靖[1]，邱璐琦[2*]（1. 黄山市产品质量检验研究院 药品检验部，安徽 黄山 245000；2. 浙江中医药大学附属第三医院 中药药剂科，杭州 310000）

摘要：目的 采用网络药理学、分子对接技术结合动物实验，探讨益肾活血方治疗肾纤维化的作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库获取益肾活血方的活性成分和作用靶点；采用 GeneCards、OMIM、PharmGkb 和 TTD 数据库获取肾纤维化的疾病靶点，构建“益肾活血方成分 - 疾病靶点”网络图；采用 STRING 数据库构建蛋白质 - 蛋白质相互作用网络（PPI）；使用 R 软件进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析；对活性成分与关键靶点进行分子对接验证。动物实验采用腺嘌呤灌胃制备肾纤维化小鼠模型，给予益肾活血方灌胃治疗，连续 2 周。Masson 染色检测小鼠肾脏胶原纤维沉积水平。ELISA 法测定肾脏组织 Col-I 和 FN 蛋白水平。qRT-PCR 法验证分子对接结果。Western blot 法检测小鼠肾组织 E-cadherin、α-SMA、TP53 和 STAT3 蛋白水平。**结果** 发现关键活性成分为槲皮素、木犀草素、山柰酚、丹参酮ⅡA 等。核心靶点网络显示其关键靶点为 STAT3、TP53、HSP90AA1 等。富集分析发现益肾活血方可能通过调控 PI3K-Akt、AGE-RAGE、TNF 等信号通路改善肾纤维化。分子对接结果验证了槲皮素、木犀草素和丹参酮ⅡA 等与核心靶点均具有较强的结合能力。动物实验表明，益肾活血方能有效改善肾纤维化小鼠肾脏胶原纤维沉积，降低 Col-I 和 FN 蛋白表达水平，降低 E-cadherin 蛋白表达，促进 α-SMA 表达，还可显著下调 TP53、STAT3 的表达。**结论** 益肾活血方可能是通过槲皮素、木犀草素和丹参酮ⅡA 等关键活性成分作用于 STAT3、TP53 等靶点改善肾纤维化。

关键词：益肾活血方；网络药理学；分子对接；肾纤维化；实验验证
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1786-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.016

Effect of Yishen Huoxue decoction on renal fibrosis and related mechanism based on network pharmacology and experimental verification

YAO Ling[1], CHENG Jing[1], QIU Lu-qi[2*] (1. *Department of Drug Testing, Huangshan Institute for Product Quality Inspection Huangshan Anhui* 245000; 2. *Department of Chinese Medicine Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou* 310000)

Abstract: Objective To determine the effect of Yishen Huoxue decoction on renal fibrosis and related mechanismby network pharmacology, molecular docking technology and animal experiments. **Methods** The active components and targets of each single medicine of Yishen Huoxue decoction were obtained by TCMSP database. GeneCards, OMIM, PharmGkb and TTD databases were used to identify the disease targets for renal fibrosis. The network diagram of components and disease targets of Yishen Huoxue decoction was established. STRING database was used to estalish the protein-protein interaction network (PPI). GO function and KEGG analysis were performed by R software. Molecular docking was used to verify the binding ability of active ingredients and key targets. Adenine gavage was used to prepare a mouse model of renal fibrosis, and blood formula gavage for the kidney

基金项目：浙江中医药大学 2020 年校级科研基金（No.2020ZZ13）。
作者简介：姚玲，女，硕士，主要从事药理学、药物分析研究，email：1182158304@qq.com *通信作者：邱璐琦，女，主要从事中药药理研究，email：qxyozi@126.com

treatment was used for two weeks. Masson staining was used to detect the collagen fiber deposition levels in the kidneys of the mice. ELISA method was used to measure the level of Col-I and FN proteins in the kidney tissue. qRT-PCR method was used to verify the molecular docking. The protein level of E-cadherin, α-SMA, TP53 and STAT3 in the mouse kidney tissue was detected by Western Blot. **Results** The key active ingredients included quercetin, luteolin, kaempferol, tanshinone ⅡA and so on. The key targets covered STAT3, TP53, HSP90AA1 and so on. Enrichment analysis found that Yishen Huoxue decoction improved the renal fibrosis by regulating PI3K-Akt, AGE-RAGE, and TNF signaling pathways. The molecular docking verified that quercetin, luteolin and tanshinone ⅡA had strong bond to the key targets. Yishen Huoxue decoction significantly reduced the mRNA expression of TP53 and STAT3.The kidney revitalizing blood formula effectively improved the renal collagen fiber deposition, reduced the expression level of Col-I and FN, reduced the expression of E-cadherin protein and increased the expression of α-SMA in mice with renal fibrosis. Yishen Huoxue decoction also greatly reduced the expression of TP53 and STAT3. **Conclusion** Yishen Huoxue decoction may improve renal fibrosis through the key active ingredients such as quercetin, luteolin and tanshinone ⅡA on the key targets such as STAT3, TP53 and so on.

Key words: Yishen Huoxue decoction; network pharmacology; molecular docking; renal fibrosis; experimental verification

慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）是一种严重危害人类健康的慢性疾病，已成为全球不可忽视的公共卫生问题[1-2]。而肾纤维化是各种进展性 CKD 发展至终末期肾衰竭的共同病理特征，其实质为细胞外基质的过渡沉积、肾小管萎缩、炎性细胞的浸润等[3]。目前针对慢性肾脏疾病的治疗存在一定的有效性和安全性问题，尚无存在针对肾纤维化的特效治疗药物。根据肾纤维化的临床表现，中医将其归于“肾络癥积”的范畴，其主要是由脾肾亏虚，伴随着水湿毒瘀蓄积、肾瘀阻络所致，治疗以益肾健脾、活血化瘀方为主[4-5]。益肾活血方源于中医络病学理论及长期临床经验形成的自拟方，由黄芪、丹参、红花、当归、大黄和田七等构成，具有益肾活血通络的功效，临床主要用于慢性肾衰竭的治疗[6]。研究表明，益肾活血方可以改善单侧输尿管结扎大鼠模型的肾小管周围毛细血管网损伤和延缓肾纤维化进程[7]。此外，益肾活血方能改善腺嘌呤所致肾纤维化模型大鼠的肾功能，能降低Ⅲ型前胶原蛋白、层粘连蛋白的等纤维化标志物的表达[8]。尽管益肾活血方治疗肾纤维化具有显著的疗效，但是其改善肾纤维化的作用机制仍不明确。

近年来，网络药理学作为中医药研究领域的一种工具，弥补了传统药物研发模式中对单一药物靶标治疗策略的缺陷，开启了一种多成分 - 多靶标的新型研究模式[9]。因此，本研究拟采用网络药理学结合分子对接的手段预测并揭示益肾活血方治疗肾纤维化的作用机制，为后续的深入研究提供一定的参考。

1　材料

1.1　实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 30 只，雌雄各半，体质量为（25±5）g，饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心。实验已通过浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准（批件号：IACUC-20211015-08）。室内适应性喂养 1 周，保持温度湿度适宜，提供充足的饲料和水。

1.2　试药与仪器

益肾活血方浓缩颗粒（江阴天江药业有限公司，批号：21102773，规格：10 g/ 袋）。腺嘌呤（上海伯奥生物科技有限公司，批号：C10129556）。cDNA 第一链合成试剂盒、引物（见表 1）（上海生工生物科技有限公司）；E-cadherin（ab231303）、α- 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）（ab7818）、肿瘤蛋白 p53（TP53）（ab202026）、转录激活因子（STAT3）（ab76315）、三磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）抗体（ab8245）（Abcam 公司）；Prime Script RT Master Mix（Perfect Real Time）、TB Green Premix Ex Tag TMI（Tli RNase H plus）（日本 Takara 公司）；Centrifug 5430R 高速冷冻离心机（德国 Eppendorf）；CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-Rad）；红外激光成像系统 Odyssey（Odyssey Clx，美国基因公司）。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

引物名称	上游引物序列（5'-3'）	下游引物序列（5'-3'）	长度 /bp
TP53	CCTTACCATCATCACGCTGGAAGAC	AGGACAGGCACAAACACGAACC	25
STAT3	AATCTCAACTTCAGACCCGCCAAC	GCTCCACGATCCTCTCCTCCAG	22
HSP90AA1	ACGAAGCATAACGACGATGAGCAG	CATTGGTTCACCTGTGTCAGTCCTC	24
ESR1	CCTGGCTGGAGATTCTGATGATTGG	TCCACCATGCCTTCCACACATTTAC	25
CCND1	TGGATGCTGGAGGTCTGTGAGG	GCAGGCGGCTCTTCTTCAAGG	22
GAPDH	GATACAGTTCCCGTGTTGAC	GATACAGTTCCCGTGTTGAC	25

2 方法与结果

2.1 网络药理学

2.1.1 益肾活血方活性成分 - 靶点网络的构建及核心靶点网络的获取 通过 TCMSP 数据库，以 OB ≥ 30% 和 DL ≥ 0.18 为条件对益肾活血方各单味药的化学成分进行筛选，最终获得 133 个化学成分和 227 个对应的作用靶点。采用 GeneCards、OMIM、PharmGkb 和 TTD 数据库，获取 6636 个肾纤维化相关疾病靶点。将 227 个益肾活血方作用靶点于肾纤维化靶点进行映射，获得 204 个治疗靶点，导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建益肾活血方治疗肾纤维化的成分靶点网络图（见图 1），按度值排序前五的活性成分依次为槲皮素（quercetin）、木犀草素（luteolin）、山柰酚（kaempferol）、丹参酮ⅡA（tanshinone ⅡA）和 7-*O*- 甲基 - 异微凸剑叶莎醇（7-*O*-methylisomucronulatol）。将活性成分与疾病的交集靶点导入 STRING 数据库，采用 Cytoscape 软件中的 CytoNCA 插件进一步筛选核心靶点并将结果可视化。最终获得排名前十的核心靶点（见图 2），按照度值排序前五的依次为 STAT3、TP53、HSP90AA1、ESR1、CCND1。

2.1.2 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 采用 R 软件，以 $P < 0.05$、$q < 0.05$ 为条件，对核心靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，GO 功能结果显示，在生物过程中（BP）中，涉及脂多糖反应、细菌来源分子反应、氧化应激反应和金属离子反应等；细胞组分（CC）中，主要涉及细胞膜筏、细胞膜微区、细胞膜域、转录因子复合物和 RNA 聚合酶Ⅱ转录因子复合物等；在分子功能（MF）中主要涉及等核受体活性、转录因子活性、类固醇激素受体活性和儿茶酚胺结合活性等功能。KEGG 功能富集分析结果显示益肾活血方治疗肾纤维化主要涉及 PI3K-Akt、AGE-RAGE、TNF 等信号通路，见图 3。

2.1.3 分子对接 将关键成分输入 PubChem 数据库获取其结构文件，然后从 PDB 数据库下载关键分子的结构文件，采用 Autodock 对接每个配体和蛋白分子。分子对接结果显示，槲皮素、木犀草素、山柰酚、丹参酮ⅡA 和 7-*O*- 甲基 - 异微凸剑叶莎醇 5 个活性成分与核心靶点 STAT3、TP53、HSP90AA1、ESR1 和 CCND1 均存在结合位点，其对应的最低结合能均小于－ 5.5 kJ • mol^{-1}，见表 2。其中丹参酮ⅡA 和槲皮素对各个核心靶点之间的结合亲和力较好，提示这 2 个活性成分在益肾活血方治疗肾纤维化中起着较为重要的作用。通过 PyMol 将 6 个靶标结合较好的对接结果进行可视化，如图 4 所示。

2.2 动物实验

2.2.1 药物配制、动物分组及处理 将益肾活血方颗粒用蒸馏水进行溶解，根据人与小鼠体表面积换算系数（人 60 kg，小鼠 20 g）计算出小鼠的临床等效剂量，配制成剂量为 14.2 g/（kg • d）的药液。称取腺嘌呤粉末 750 mg，用 10 mL 羧甲基纤维素钠（CMC-Na）溶液溶解，配成 75 mg • mL^{-1} 腺嘌呤混悬液。

30 只小鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组和益肾活血方组，各 10 只。采用腺嘌呤，参考文献方法造模 [10]。待模型建立成功后，益肾活血方组给予 14.2 g • kg^{-1} 灌胃给药，正常组和模型组给予等体积生理盐水，每日 1 次，连续灌胃 2 周。

2.2.2 Masson 染色观察益肾活血方对肾纤维化小鼠肾组织病理的影响 小鼠肾脏组织采用 4% 多聚甲醛固定，经脱水、透明、包埋、切片，行 Masson 染色，采用蔡司正置显微镜进行观察，采用 Image J 软件计算阳性面积百分比，以评价肾组织纤维化水平。结果如图 5 所示，对照组小鼠仅存在少量蓝色胶原纤维沉积。与对照组相比，模型组小鼠表现出明显的蓝色胶原纤维沉积，肾小管扩张，肾小球萎缩；益肾活血方组肾组织蓝色纤维沉积显著低于模型组，且肾小球及肾小管结构有所改善。

2.2.3 酶联免疫吸附法检测益肾活血方对小鼠肾组织Ⅰ型胶原蛋白（Col-Ⅰ）和纤维连接蛋白（FN）水平的影响 取肾脏组织，用 PBS 冲洗，并在冰上匀浆，4 ℃、12 000×g 离心 10 min，去除组织残留物，取上清液。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定上清液总蛋白浓度，按照酶联免疫吸附法试剂盒说明书检测肾组织 Col-Ⅰ和 FN 水平。结果如表 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠肾组织 Col-Ⅰ和 FN 水平显著升高；与模型组比较，益肾活血方组小鼠肾

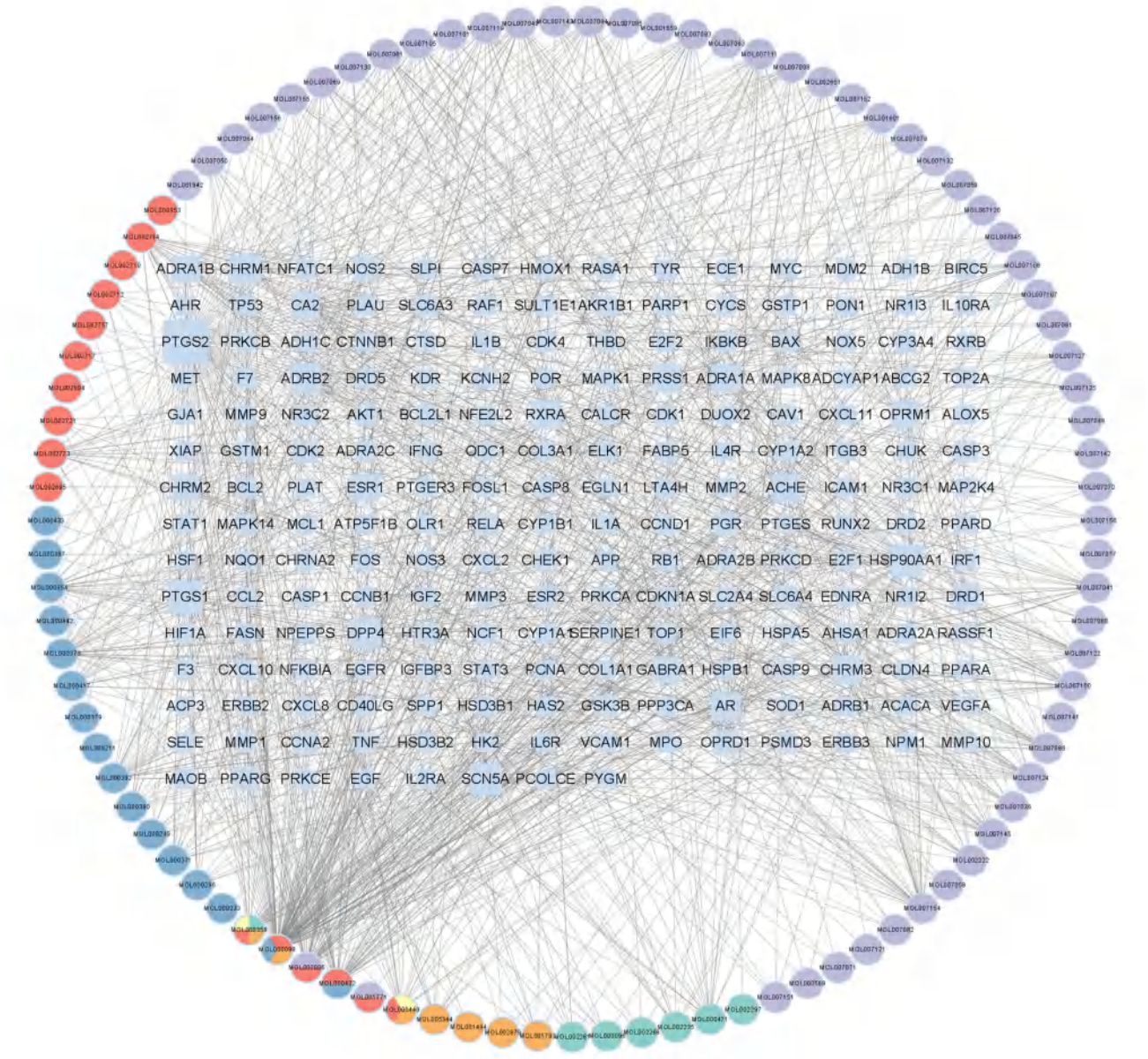


图 1　益肾活血方治疗肾纤维化活性成分 - 靶点网络图

Fig 1　Network diagram of active ingredients in Yishen Huoxue decoction for renal fibrosis and targets

注：圆形代表活性成分，不同颜色代表不同单味药物成分，同一圆形中不同颜色代表不同单味药之间共有活性成分；正方形代表靶点，形状越大表示度值越高。

Note：The circle represents the active ingredients.The presence of different colors in a circle represents the common active ingredient among different single drugs. The square represents the target，and the larger the area，the higher the degree value.

组织 Col-Ⅰ和 FN 水平显著降低。

2.2.4　Western blot 法检测益肾活血方对小鼠肾组织 E-cadherin 和 α-SMA 表达的影响　取各组肾组织，加入 RIPA 裂解液匀浆，提取蛋白。蛋白样本经 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，封闭后加入 E-cadherin、α-SMA、TP53、STAT3、GAPDH 抗体，4 ℃孵育过夜；加入山羊抗兔抗体，孵育 2 h，用 Odyssey 红外激光成像系统扫膜并分析。结果如图 6 与表 4 所示，模型组小鼠 E-cadherin 蛋白表达显著低于对照组，而 α-SMA 蛋白表达显著高于对照组；益肾活血方可显著提高模型组小鼠肾组织 E-cadherin 蛋白表达，降低模型组小鼠肾组织 α-SMA 蛋白表达。

2.2.5　荧光实时定量 PCR 法检测益肾活血方对小鼠肾组织 TP53、STAT3、HSP90AA1、ESR1、CCND1 mRNA 表达的影响　提取肾组织 RNA，逆转录为 cDNA，以 GAPDH 为内参，通过 qRT-PCR 法检测 mRNA 表达水平，并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

结果显示，与对照组比较，模型组小鼠肾组织

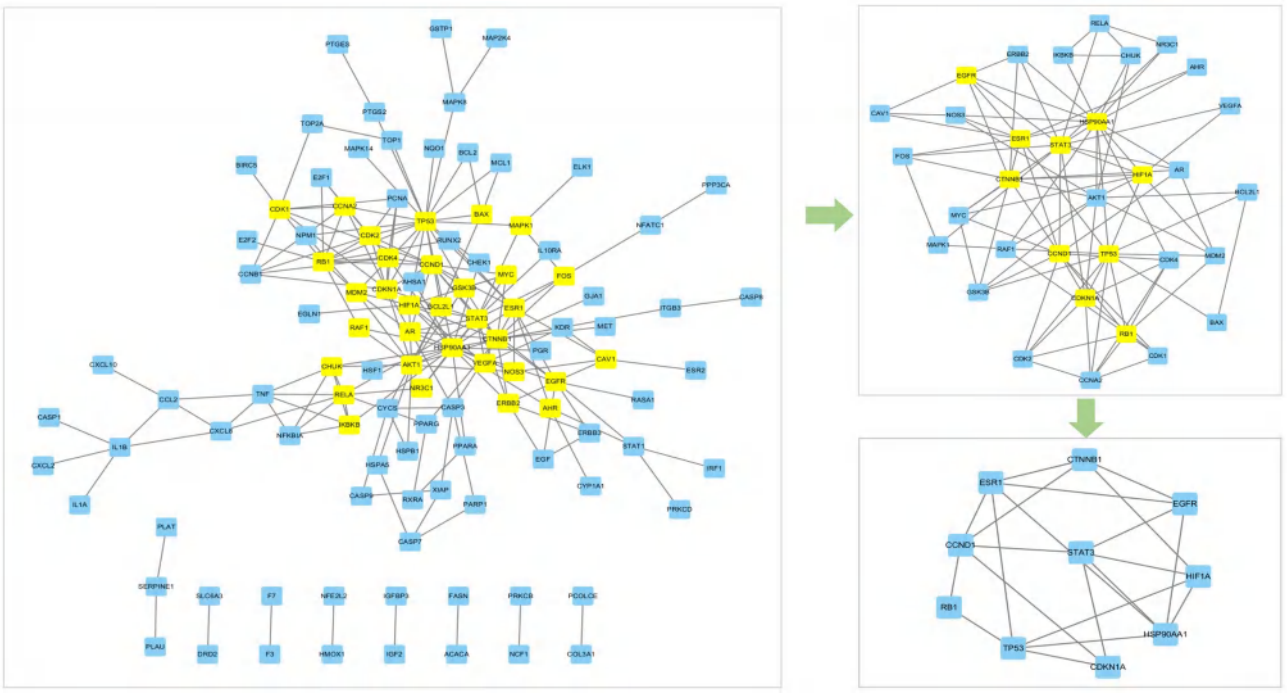


图 2 益肾活血方治疗肾纤维化核心靶点识别

Fig 2 Identification of core targets of Yishen Huoxue decoction for renal fibrosis

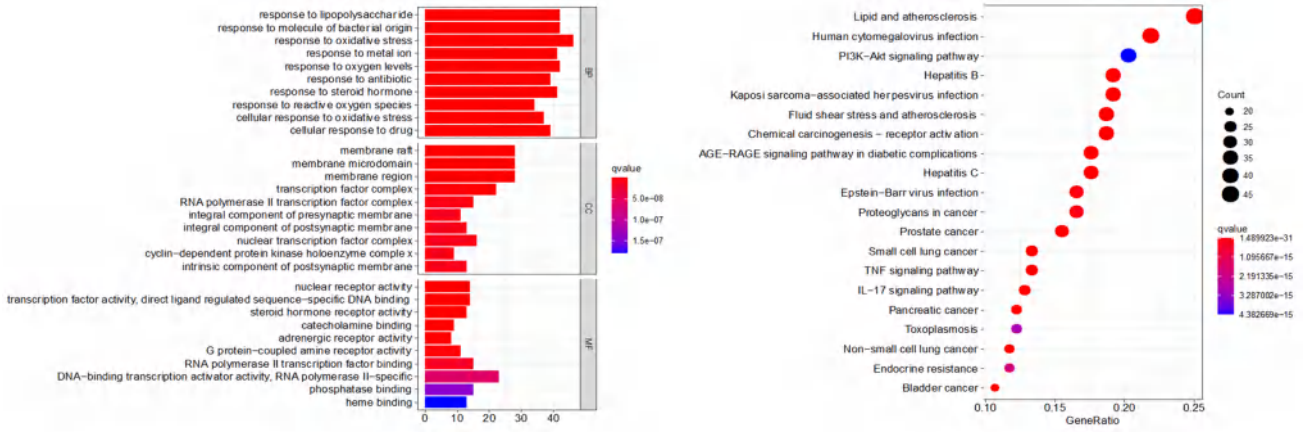


图 3 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

Fig 3 GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis

表 2 核心成分与关键靶点分子对接结果

Tab 2 Docking results of core components and key targets

靶点	结合能 /（kcal・mol^{-1}）				
	槲皮素	木犀草素	山柰酚	丹参酮	7-*O*- 甲基 - 异微凸剑叶莎醇
TP53	− 8.2	− 8.6	− 8.6	− 8.4	− 7.7
STAT3	− 8.2	− 7.9	− 8.0	− 8.5	− 6.7
HSP90AA1	− 8.7	− 8.4	− 8.6	− 8.8	− 7.8
ESR1	− 8.4	− 8.6	− 8.1	− 8.9	− 7.2
CCND1	− 8.1	− 7.9	− 7.8	− 8.4	− 7.0

TP53、STAT3、HSP90AA1 mRNA 表达显著上升，CCND1 mRNA 表达显著降低。与模型组比较，益肾活血方组小鼠肾组织 TP53、STAT3 mRNA 表达显著降低，而 CCND1 mRNA 表达无显著差异，见表 5。

2.2.6 益肾活血方对小鼠肾组织 TP53 和 STAT3 蛋白表达的影响 如图 6 和表 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠肾组织 TP53 和 STAT3 蛋白表达水平显著升高；与模型组比较，益肾活血方组 TP53 和 STAT3 蛋白表达水平显著降低。

2.2.7 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

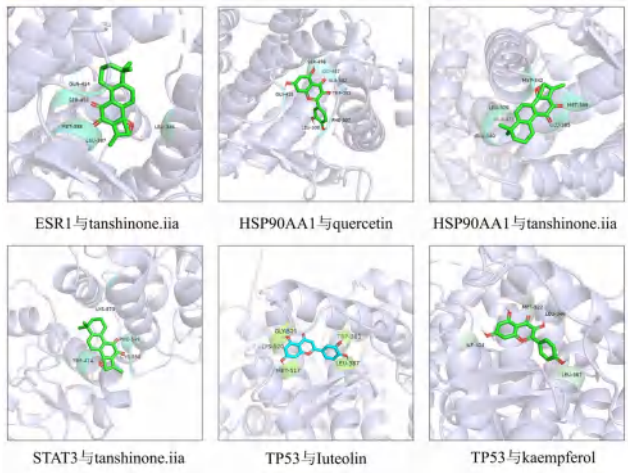


图 4　分子对接结果可视化

Fig 4　Visualization of molecular docking results

表 3　益肾活血方对肾纤维化小鼠肾组织 Col-Ⅰ和 FN 水平的影响（n = 5）

Tab 3　Effect of Yishen Huoxue decoction on the expression of Col-I and FN in renal tissue of mice with renal fibrosis (n = 5)

组别	Col-Ⅰ	FN
对照组	208.17±10.62	910.25±31.23
模型组	688.21±20.78**	1547.46±25.16**
益肾活血方组	480.76±50.12##	1213.34±67.12##

注：与对照组比较，**P < 0.01，与模型组比较，##P < 0.01。

Note：Compared with the control group，**P < 0.01；compared with the model group，##P < 0.01.

3　讨论与结论

CKD 是一种常见的全球公共卫生问题，发病率高达 13%[11]。在 CKD 的病因中，肾纤维化被认为是驱动 CKD 进展为终末期肾衰竭的主要病理过程[12]。肾纤维化的进展是一个动态的过程，其主要特点是肾间质成纤维细胞的激活和细胞外基质的过渡堆积[13]。随着对肾纤维化机制的研究深入，人们对其发病机制有了新的认识，但仍然没有可用的治疗方法阻遏 CKD 向终末期肾衰竭发展。因此，亟需深入了解肾纤维化的分子机制，以促进新的抗纤维化疗法和药物开发。

中医认为肾纤维化的主要病机为“关格”“肾劳”等范畴，临床上以脾肾气虚、湿瘀互阻最为常见[14]。益肾活血方具有健脾补肾益气，活血化瘀之功用，临床主要用于治疗慢性肾衰竭。大量的临床研究和基础研究证实，益肾活血方是治疗

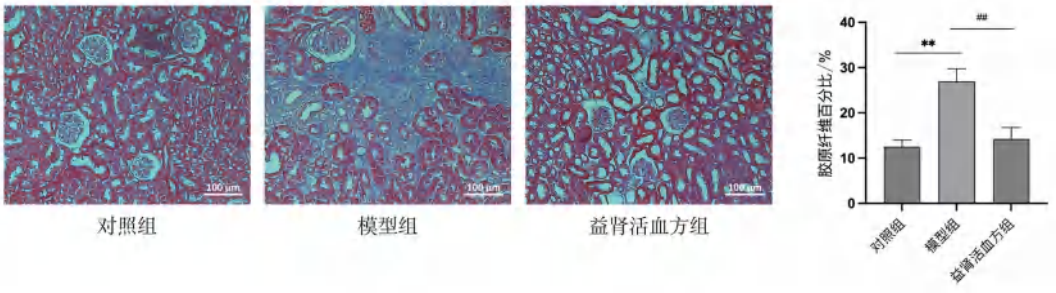


图 5　益肾活血方对肾纤维化小鼠肾组织病理学的影响（Masson 染色，×200）

Fig 5　Effect of Yishen Huoxue decoction on renal histopathology of mice with renal fibrosis（Masson staining，×200）

注：与对照组比较，**P < 0.01，与模型组比较，##P < 0.01。

Note：Compared with the control group，**P < 0.01；compared with the model group，##P < 0.01.

表 4　益肾活血方对肾纤维化小鼠肾组织中 E-cadherin、α-SMA、TP53 和 STAT3 蛋白水平表达的影响（n = 3）

Tab 4　Effect of Yishen Huoxue decoction on the protein expression of E-cadherin，α-SMA，TP53 and STAT3 levels in renal tissue of mice with renal fibrosis (n = 3)

组别	E-cadherin	α-SMA	TP53	STAT3
对照组	1.14±0.86	1.01±0.13	0.99±0.16	0.98±0.05
模型组	0.29±0.12**	1.72±0.69**	1.56±0.51**	1.76±0.10**
益肾活血方组	0.78±0.24##	1.42±0.61##	1.24±0.41#	1.56±0.28##

注：与对照组比较，**P < 0.01，与模型组比较，#P < 0.05，##P < 0.01。

Note：Compared with the control group，**P < 0.01；compared with the model group，#P < 0.05，##P < 0.01.

表 5　益肾活血方对肾纤维化小鼠肾组织关键基因 mRNA 表达的影响（n = 10）

Tab 5　Effect of Yishen Huoxue decoction on the mRNA expression of key genes in renal tissue of mice with renal fibrosis (n = 10)

组别	TP53	STAT3	HSP90AA1	ESR1	CCND1
对照组	1.01±0.05	0.99±0.03	0.99±0.07	0.97±0.06	0.99±0.08
模型组	1.48±0.02**	1.67±0.06**	1.52±0.09**	0.95±0.09	0.44±0.11**
益肾活血方组	1.19±0.12##	1.31±0.02##	1.49±0.04	1.02±0.25	0.51±0.06

注：与对照组比较，**P < 0.01，与模型组比较，##P < 0.01。

Note：Compared with the control group，**P < 0.01；compared with the model group，##P < 0.01.

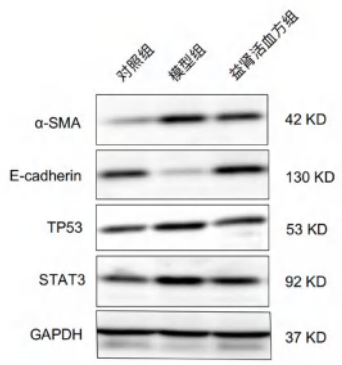


图 6 益肾活血方对肾纤维化小鼠肾组织中 E-cadherin、α-SMA、TP53 和 STAT3 蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 6 Effect of Yishen Huoxue decoction on the protein expression of E-cadherin，α-SMA，TP53 and STAT3 levels in the renal tissue of mice with renal fibrosis（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

肾纤维化的有效方剂 [15-16]。钟建等 [17] 研究表明益肾活血方可以通过改善单侧输尿管结扎大鼠肾脏病理损伤、改善肾纤维化相关标志基因表达从而阻遏肾纤维化的发展。此外，本研究发现益肾活血方可有效改善腺嘌呤小鼠肾组织胶原纤维沉积，降低 Col-I 和 FN 表达，抑制上皮 - 间充质相互作用（EMT）关键蛋白表达，可有效改善肾间质纤维化。然而，益肾活血方治疗肾纤维化的具体有效活性成分和作用机制尚且未知。

本研究通过构建益肾活血方治疗肾纤维化的成分 - 靶点网络，获得其潜在活性成分可能是槲皮素、木犀草素、山柰酚、丹参酮等。诸多研究表明，槲皮素对抗脏器纤维化具有良好的疗效 [18]。研究表明，槲皮素可通过激活 AMPK，作用于 TGF-β1 信号通路，抑制 Smad3 磷酸化，从而减轻单侧输尿管结扎（UUO）大鼠肾间质纤维化 [19]。此外，槲皮素还可通过抑制 Sonic Hedgehog 信号通路，抑制肾小管细胞上皮间质转化从而改善肾纤维化 [20]。木犀草素可通过抑制 STAT3 激活，从而减轻糖尿病肾病肾小球硬化和肾间质纤维化 [21]。体内外研究表明，山柰酚可改善糖尿病肾病大鼠肾纤维化并可降低 NRK-52E 细胞和 RPTEC 细胞中的氧化应激和 TGF-β1 表达 [22]。Ji 等 [23] 研究证实，山柰酚可通过激活 BMP-7-Smad1/5 信号通路改善肾间质纤维化。这些研究表明益肾活血方可能通过上述活性成分协同对抗肾纤维化。

对核心靶点进行拓扑分析，发现 STAT3、TP53、HSP90AA1、ESR1 等可能是益肾活血方治疗肾纤维化的关键靶点。研究表明，STAT3 敲低的转基因小鼠在链脲佐菌素诱导后，表现出较低的蛋白尿水平和纤维化现象 [24]。既往研究也证实 STAT3 磷酸化在肾纤维化发展中有重要作用 [25-26]。TP53 是急性肾脏病中肾小管损伤和死亡的关键介质 [27]，靶向消融 TP53 可以显著抑制肾纤维化的发展 [28]。研究表明，HSP90AA1 在心肌成纤维细胞中与 TGF-β1 受体紧密连接，提示两者可能存在相互作用 [29]。但在肾纤维化中，HSP90AA1 的作用有待进一步探究。

KEGG 通路富集结果显示，PI3K-Akt、AGE-RAGE、TNF 及 IL-17 等信号通路可能是益肾活血方治疗肾纤维化的重要机制，与上述核心靶标存在一定的联系。PI3K/Akt/mTOR 在纤维化过程中发挥着至关重要的作用，它调控着纤维化的上下游多种因素 [30]。Dou 等 [31] 研究发现自噬被 Akt/mTOR 信号通路激活，从而在肾小管损伤和肾纤维化中发挥保护作用。诸多研究表明 AGE-RAGE 信号通路的激活参与糖尿病肾病的肾纤维化进程 [32]。目前研究表明，抑制晚期糖基化终产物（AGEs）的产生可以减少其刺激的肾系膜细胞中转化生长因子和结缔组织生长因子的过度表达，从而改善肾纤维化 [33]。TNF 信号通路及 IL-17 信号通路通过激活炎症细胞因子从而损伤肾实质 [34-35]。

进一步通过分子对接探究活性成分和核心靶点的结合作用，结果显示槲皮素、木犀草素、山柰酚、丹参酮和 7-*O*- 甲基 - 异微凸剑叶莎醇与核心靶点 STAT3、TP53、HSP90AA1、ESR1 和 CCND1 等均能较好地结合。本研究采用 qRT-PCR 法和 Western blot 法对分子对接进行实验验证，结果显示益肾活血方可显著降低 TP53 和 STAT3 表达，初步提示 TP53 和 STAT3 可能是益肾活血方改善肾纤维化的作用靶点。

综上所述，本研究使用网络药理学初步揭示了益肾活血方治疗肾纤维化的潜在机制，并使用分子对接技术进行预测，证明益肾活血方通过多靶点、多通路治疗肾间质纤维化。为临床应用益肾活血方治疗肾纤维化提供一定的理论基础。然而，后续仍需进行相关体外实验进一步确证益肾活血方治疗肾纤维化的分子机制。

参考文献

[1] Allison SJ. Targeting ARNT to attenuate renal fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol，2018，14（9）：535.

[2] Zhao XD，Kong YL，Liang BE，et al. Mechanosensitive Piezo1 channels mediate renal fibrosis [J]. JCI Insight，2022，7（7）：e152330.

[3] Starling S. Renal fibrosis：pericytes activate complement in fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol，2017，13（5）：262.

[4] 胡军福，张威英，龚彩弟，等 . 益肾通络法治疗肾纤维化的 Meta 分析 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（5）：1141-1147.

[5] 王杰，陈艳琼，何凯杰，等 . 从肾络亏虚理论探讨肾脏纤维化的病机与治疗策略 [J]. 世界最新医学信息文摘，

2017，17（99）：98-99，103.
[6] 朱玲萍，王日权，王云飞 . 益肾活血方治疗慢性肾功能衰竭临床观察 [J]. 光明中医，2020，35（16）：2497-2499.
[7] 钟建，赵宁博，刘朝业 . 基于肾络瘀阻研究益肾活血方对单侧输尿管结扎大鼠肾脏血管内皮生长因子和 Notch 信号通路的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2015（6）：577-581.
[8] 连晓江 . 益肾活血方对腺嘌呤诱发肾衰大鼠的实验研究 [D]. 郑州：河南中医药大学，2017.
[9] 袁甜，崔琳琳，王莹，等 . 中药网络药理学最新进展 [J]. 中医药学报，2021，49（1）：101-106.
[10] 陈红淑，杨元宵，周小杰，等 . 肾气丸通过 TGF-β1/Smads/ILK 信号途径干预肾小管上皮细胞间充质转分化的分子机制 [J]. 中华中医药杂志，2016，31（6）：2102-2105.
[11] Evans M，Lewis RD，Morgan AR，et al. A narrative review of chronic kidney disease in clinical practice：current challenges and future perspectives [J]. Adv Ther，2022，39（1）：33-43.
[12] Chen YY，Chen XG，Zhang S. Druggability of lipid metabolism modulation against renal fibrosis [J]. Acta Pharmacol Sin，2022，43（3）：505-519.
[13] Liu P，Zhang J，Wang Y，et al. Natural products against renal fibrosis modulation of SUMOylation [J]. Front Pharmacol，2022，13：800810.
[14] 樊博雅，杨康，杨洪涛 . 肾间质纤维化的机制与中西医干预研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志，2020，21（4）：363-365.
[15] 李湛民，胡世隆，刘铁军，等 . 益肾活血方治疗高龄肾虚血瘀型男性不育的疗效观察 [J]. 中华男科学杂志，2021，27（6）：530-534.
[16] 方桂玉 . 基于网络药理学探讨益肾活血方调节 PI3K/AKT/HIF-1α 信号通路抗肾纤维化的机制研究 [D]. 南宁：广西中医药大学，2021.
[17] 钟建，赵宁博，刘朝业，等 . 益肾活血方通过 miR-126/VEGF-Notch 信号通路改善肾纤维化 [J]. 中华危重病急救医学，2018，30（10）：991-995.
[18] Lu H，Wu LF，Liu LP，et al. Quercetin ameliorates kidney injury and fibrosis by modulating M1/M2 macrophage polarization [J]. Biochem Pharmacol，2018，154：203-212.
[19] Liu T，Yang QF，Zhang X，et al. Quercetin alleviates kidney fibrosis by reducing renal tubular epithelial cell senescence through the SIRT1/PINK1/mitophagy axis [J]. Life Sci，2020，257：118116.
[20] Liu XH，Sun N，Mo N，et al. Quercetin inhibits kidney fibrosis and the epithelial to mesenchymal transition of the renal tubular system involving suppression of the Sonic Hedgehog signaling pathway [J]. Food Funct，2019，10（6）：3782-3797.
[21] Zhang MY，He LY，Liu JS，et al. Luteolin attenuates diabetic nephropathy through suppressing inflammatory response and oxidative stress by inhibiting STAT3 pathway [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes，2021，129（10）：729-739.
[22] Sharma D，Gondaliya P，Tiwari V，et al. Kaempferol attenuates diabetic nephropathy by inhibiting RhoA/Rho-kinase mediated inflammatory signalling [J]. Biomed Pharmacother，2019，109：1610-1619.
[23] Ji XJ，Cao J，Zhang LT，et al. Kaempferol protects renal fibrosis through activating the BMP-7-Smad1/5 signaling pathway [J]. Biol Pharm Bull，2020，43（3）：533-539.
[24] Zheng C，Huang L，Luo W，et al. Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice [J]. Cell Death Disease，2019，10（11）：848.
[25] Sun HJ，Xiong SP，Cao X，et al. Polysulfide-mediated sulfhydration of SIRT1 prevents diabetic nephropathy by suppressing phosphorylation and acetylation of p65 NF-κB and STAT3 [J]. Redox Biol，2021，38：101813.
[26] Chen W，Yuan H，Cao WM，et al. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation [J]. Theranostics，2019，9（14）：3980-3991.
[27] He LY，Wei QQ，Liu J，et al. AKI on CKD：heightened injury，suppressed repair，and the underlying mechanisms [J]. Kidney Int，2017，92（5）：1071-1083.
[28] Ying Y，Kim J，Westphal SN，et al. Targeted deletion of p53 in the proximal tubule prevents ischemic renal injury [J]. J Am Soc Nephrol，2014，25（12）：2707-2716.
[29] Zhou ZQ，Zheng L，Tang CF，et al. Identification of potentially relevant genes for excessive exercise-induced pathological cardiac hypertrophy in Zebrafish [J]. Front Physiol，2020，11：565307.
[30] Yang CC，Sung PH，Chen KH，et al. Valsartan-and melatonin-supported adipose-derived mesenchymal stem cells preserve renal function in chronic kidney disease rat through upregulation of prion protein participated in promoting PI3K-Akt-mTOR signaling and cell proliferation [J]. Biomed Pharmacother，2022，146：112551.
[31] Dou F，Liu YT，Liu LM，et al. Aloe-emodin ameliorates renal fibrosis via inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in vivo and in vitro [J]. Rejuvenation Res，2019，22（3）：218-229.
[32] Thallas-Bonke V，Coughlan MT，Tan AL，et al. Targeting the AGE-RAGE axis improves renal function in the context of a healthy diet low in advanced glycation end-product content [J]. Nephrology（Carlton），2013，18（1）：47-56.
[33] Zhang S，Wang DJ，Xue NN，et al. Nicousamide protects kidney podocyte by inhibiting the TGFβ receptor Ⅱ phosphorylation and AGE-RAGE signaling [J]. Am J Transl Res，2017，9（1）：115-125.
[34] Xu CH，Wang L，Zhang Y，et al. Tubule-specific Mst1/2 deficiency induces CKD YAP and non-YAP mechanisms [J]. JASN，2020，31（5）：946-961.
[35] Mcmaster WG，Kirabo A，Madhur MS，et al. Inflammation，immunity，and hypertensive end-organ damage [J]. Circ Res，2015，116（6）：1022-1033.

（收稿日期：2023-02-04；修回日期：2023-04-27）

中华眼镜蛇神经毒素相转化水凝胶微针的制备及其初步镇痛作用研究

陈月，许玲玲，葛廷雨，庄富萍，汪电雷*（安徽中医药大学药学院，合肥 230012）

摘要：目的 以中华眼镜蛇神经毒素为模型药物制备相转化水凝胶微针，并对其质量以及镇痛作用进行评价。**方法** 采用两步法制备神经毒素相转化水凝胶微针。利用光学显微镜和扫描电子显微镜对微针形貌进行考察，筛选最佳处方，在最佳处方下对微针的载药量、机械性能、体外溶胀、体外透皮等进行综合评价。最后通过热板实验考察神经毒素相转化水凝胶微针的镇痛作用。**结果** 针尖部位最佳处方为聚乙烯醇 / 葡萄糖水溶液（84/16，*W*/*W*），背衬层最佳处方为聚乙烯醇水溶液（25%，*W*/*W*）。光学显微镜和扫描电镜下微针针体垂直，排列整齐，矩阵清晰；HE 染色结果表明微针可以刺入皮肤表层为药物递送提供通道。180 min 后溶胀率达到 210%；载药量可达到 23.4%；12 h 后体外释放率接近 85%；6 h 后微针的体外透皮率达到 80%，而中华眼镜蛇神经毒素水溶液几乎没有穿过皮肤。药效学实验表明，神经毒素相转化水凝胶微针具有镇痛作用。**结论** 本实验制备的微针可以刺破皮肤，在体内可以达到镇痛的疗效，为蛋白类药物剂型的开发提供了新的思路和策略。

关键词：中华眼镜蛇神经毒素；透皮给药；相变水凝胶微针；镇痛药效

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1794-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.017

Naja atra neurotoxin phase-transition hydrogel-forming microneedles: preparation and analgesic effect

CHEN Yue, XU Ling-ling, GE Ting-yu, ZHUANG Fu-ping, WANG Dian-lei* (*College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei* 230012)

Abstract: Objective To prepare Naja atra neurotoxin phase-transition hydrogel-forming microneedles and to evaluate its quality and analgesic effect. **Methods** Naja atra neurotoxin phase-transition hydrogel-forming microneedles were prepared by two-step method. The best prescription was selected by optical microscope and scanning electron microscope, and the drug loading, mechanical properties, in vitro swelling and skin penetration of microneedles were evaluated comprehensively. Finally, the analgesic effect of Naja atra neurotoxin phase-transition hydrogel-forming microneedles were determined by hot plate test in mice. **Results** The best formula for the tip part was PVA/Glu aqueous solution (84/16, *W*/*W*), and that for the backing layer was PVA aqueous solution (25%, *W*/*W*). Under the optical microscope and scanning electron microscope, the microneedle was vertical, arranged neatly with clear matrix. HE staining showed that microneedles pierced into the surface of the skin to provide a channel for drug delivery. After 180 min, the swelling rate reached 210%. The drug loading reached 23.4%. After 12 hours, the in vitro release rate was close to 85%. The skin penetration rate of microneedles reached 80% after 6 hours, while Naja atra neurotoxin aqueous solution almost did not permeate through the skin. The pharmacodynamic tests showed that Naja atra neurotoxin phase-transition hydrogel-forming microneedles had analgesic effect. **Conclusion** The microneedle can pierce through the skin and achieve analgesic effect in vivo, which provides a new idea for the

基金项目：安徽中医药大学自然科学研究重点项目（No.2020zrzd12）；安徽省自然科学基金杰青项目（No.2108085J45）。

作者简介：陈月，女，硕士，主要从事药物代谢动力学研究，email：1035608040@qq.com *通信作者：汪电雷，男，教授，主要从事中药学、药代动力学研究，email：dlwang@ahtcm.edu.cn

development of protein drug dosage forms.

Key words: Naja atra neurotoxin transdermal; phase-transition hydrogel-forming microneedle; analgesic effect

中华眼镜蛇经毒素（NANT）的镇痛作用有别于阿片类药物，表现为起效慢，作用效价高，维持时间久，无耐受性和成瘾性，在临床上具有良好的镇痛效果[1]，适用于慢性、顽固性、持续性疼痛的治疗，是一种很有潜力的新型镇痛药物。由于神经毒素是蛋白多肽类药物，口服易失活，生物利用度低[2]，国内销售的科博肽注射液起效快，生物利用度高，但注射给药适应性差，还会导致体内药物分布过快，有呼吸抑制的不良反应。因此，有必要开发一种新的给药途径。

相转化水凝胶微针是由亲水聚合物交联形成的，反复冷冻 - 解冻循环后，其物理交联形成微晶域，使微针保持韧性在皮下不易溶解。微针插入皮肤后吸收组织间液发生膨胀，针尖部分的药物可通过微孔道扩散到皮肤微循环中进行全身吸收，可以更加稳定有效地释放药物[3]。相对于其他微针，相转化水凝胶微针具有生物相容性、无毒性，可以合理地控制给药剂量，并且药物释放完之后微针可以完全从皮肤中去除，没有残留。张蓉等[4]制备了羧甲基纤维素钠相转化水凝胶微针用于药物递送，结果表明 24 h 内，药物释放率可达到 60%。严琴英等[5]用聚乙烯醇和葡聚糖两种高分子材料制备了石杉碱甲水凝胶微针，结果表明微针具有良好的机械性能和皮肤穿刺性能，并且在 72 h 内石杉碱甲的累积透皮率达到 85% 以上。Tekko 等[6]制备了一种新型聚乙烯醇 / 聚乙烯吡咯烷酮水凝胶微针用于甲氨蝶呤的递送，该微针在新生猪皮肤中有较好的插入能力以及适度的溶胀性能，大鼠背部贴片 1 h 后血液中出现了甲氨蝶呤，24 h 后甲氨蝶呤在血液中浓度达到了峰值。

本实验以聚乙烯醇 AH-26（PVA）和葡聚糖 6000（Dex）为辅料[7]，制备了有镇痛疗效的神经毒素相转化水凝胶微针（NANT-PTH-MNs）。并对微针的形貌、机械性能、载药量、体外释放、体外透皮等方面进行评价，并通过体内药效实验考察 NANT-PTH-MNs 透皮给药的镇痛作用，旨在提高大分子药物的生物利用度，为新型镇痛药剂型的开发和应用提供新的思路。

1　材料

1.1　试药

NANT 对照品（纯度＞ 95%，浙江舟山眼镜蛇公司）；PVA（南京森贝伽生物科技有限公司）；透明质酸（HA）（山东西亚化学股份有限公司）；葡聚糖 6000、三氟乙酸（上海麦克林生化科技有限公司）；羧甲基纤维素（CMC，山东西亚化学工业有限公司）；乌拉坦（国药集团化学试剂有限公司）；色谱乙腈（瑞典欧森巴克环保化学公司）。

1.2　仪器

低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；FA1004 电子天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；HJ-6A 型恒温磁力加热搅拌器（苏州岛津仪器有限公司）；微针模具（浙江台州微芯医药科技有限公司）；高效液相色谱仪（日本岛津公司）；SYSTEM918-12 干加热自动透皮系统（美国 LOGAN 公司）；Milli-Q GradientA10 超纯水器（美国 Millipore 公司）；RB-200 智能热板（成都泰盟科技有限公司）。

1.3　动物

SPF 级 SD 大鼠（200±20）g 及昆明小鼠（18±5）g [小鼠的合格证号为：SCXK（豫）2019-0002，大鼠的合格证号：SCXK（鲁）20190003（安徽医科大学动物实验中心]，本实验涉及的动物实验经安徽中医药大学伦理委员会批准。

2　方法与结果

2.1　NANT 的含量测定

色谱柱：Dikma Plastil ODS 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 A：0.1% 三氟乙酸（TFA）- 水溶液，流动相 B：0.1%TFA- 乙腈溶液；梯度洗脱（0 ～ 10 min，8% ～ 95%B；10 ～ 12 min，95%B；12 ～ 20 min，5% ～ 95%B）；柱温：35 ℃；流速：1.0 mL • min^{-1}；进样量：20 μL；波长：277 nm。

精密称取 2.51 mg NANT 对照品，用流动相 B 定容至 10 mL 得到 251 μg • mL^{-1} 对照品储备液。精密称取对照品储备液，分别稀释成 200.8、150.6、100.9、50.5、20.2、10.1 μg•mL^{-1} 的溶液，进样测定，以进样浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得 $y = 354.04x - 725.78$（$r = 0.9996$），线性范围为 10.1 ～ 200.8 μg•mL^{-1}；取 NANT 对照品溶液低、中、高（20.2、100.9、200.8 μg • mL^{-1}）浓度，按 “2.1” 项下色谱条件在 1

d 内分别测定 5 次，连续测定 3 d，结果日间精密度 *RSD* 分别为 1.1%、1.4%、1.5%，日内精密度分别为 1.1%、1.6%、1.4%；取 6 份 NANT-PTH-MNs 溶胀后测定 NANT 质量浓度，结果重复性实验 *RSD* 为 1.2%；取 NANT-PTH-MNs 溶胀后的供试液，加入不同浓度的对照品溶液（20.2、100.9、200.8 μg • mL^{-1}），以计算的质量浓度值和真实质量浓度值之比计算准确度，得到的平均回收率为 97.88%、98.21%、98.63%，*RSD* 分别为 1.4%、1.9%、1.2%；空白微针对 NANT 没有干扰，结果见图 1。表明本方法适用于测定 NANT-PTH-MNs 中神经毒素的含量。

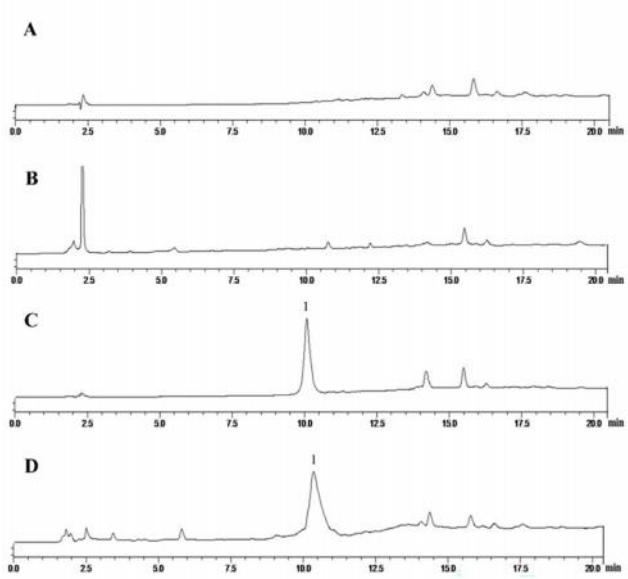


图 1 NANT 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of NANT

A. 流动相 B（mobile phase B）；B. 空白相转化水凝胶微针（blank PTH-MNs）；C.NANT 对照品（NANT reference substance）；D. 神经毒素相转化水凝胶微针（NANT-PTH-MNs）；1. NANT

2.2 相转化水凝胶微针的制备

2.2.1 微针针尖处方筛选 称取 16 g PVA 置于广口瓶中，加入 84 g 超纯水，95 ℃搅拌加热使其完全溶解，得 16%PVA，吸取适量 PVA 溶液加入 HA 粉末，搅拌均匀，配制 PVA/HA 比例分别为 90/10，88/12，84/16，82/18（*W*/*W*）的混合溶液。同理配制 PVA/CMC，PVA/DEX 不同比例的混合溶液 [8]。

显微镜下观察 PVA/HA、PVA/CMC 和 PVA/Dex 三种辅料制备的微针，如图 2 所示，PVA/HA 和 PVA/CMC 组成的微针针体不垂直或针尖弯曲，但 PVA/Dex 组成的微针针体垂直完整，排列整齐，故选用 PVA/Dex 作为相转化水凝胶微针（PTH-MNs）的针尖材料。对 PVA/Dex 不同比例的 PTH-MNs 进行鼠皮穿刺实验，结果如图 3，其中针尖材料溶液 PVA/Dex 含量为 84/16 时，蓝色孔洞数量最多且肉眼清晰可见。随着 PVA 比例增加，机械强度反而下降。综上，选择 PVA/Dex 比例为 84/16 进行后续实验。

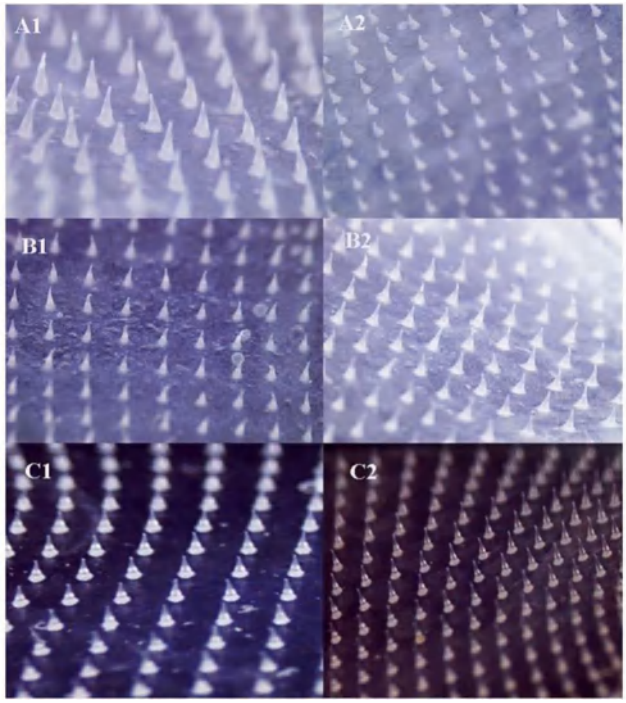


图 2 不同辅料构成针尖的微针的形态

Fig 2 Morphology of microneedle morphology under different excipients

A1 ～ 2. PVA/HA；B1 ～ 2. PVA/CMC；C1 ～ 2. PVA/Dex

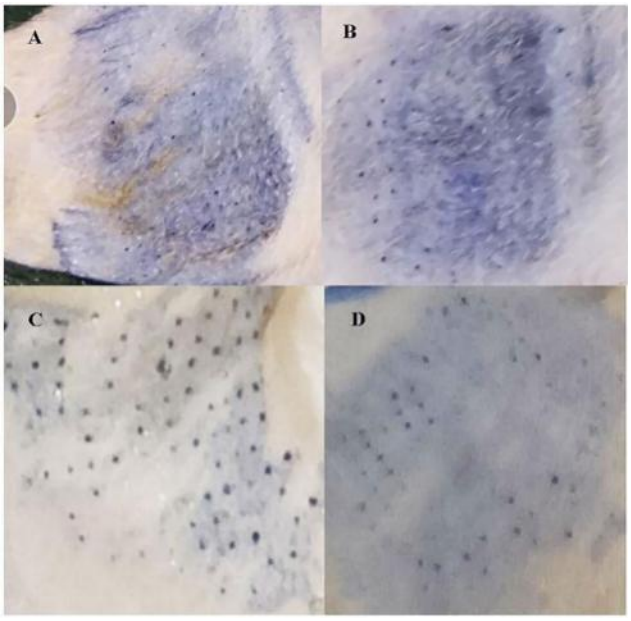


图 3 不同 PVA/Dex 比例制备的 PTH-MNs 鼠皮穿刺情况

Fig 3 In vitro skin puncture of rat of PVA/Dex-PTH-MNs

A. 90/10；B. 88/12；C. 84/16；D. 82/18

2.2.2 微针背衬层的制备 称取 25 g PVA 放入广

口瓶中，加入 75 g 超纯水，95 ℃搅拌加热使其完全溶解，得 25%PVA 水溶液 [9-10]。取该溶液平铺于璃板上，取另一玻璃板均匀夹住，经－20 ℃下冷冻 8 h，4 ℃解冻 4 h，冷冻 - 解冻循环两次。

2.2.3　NANT-PTH-MNs 的制备　取适量的 NANT 粉末于超纯水中，配制成 NANT 水溶液，加至“2.3.1”下针尖溶液中，搅拌 2 h。取含药针尖溶液 300 μL，注入模具中，4 ℃，3000 r • min $^{-1}$ 下离心 10 min。使针尖注入到微针模具孔内，贴上背衬层，在－20 ℃冷冻 8 h，4 ℃解冻 4 h，循环两次 [11]，放入烘箱 25 ℃干燥 24 h 即得。

2.3　形貌考察

在光学显微镜下观察 PVA/HA、PVA/CMC 和 PVA/Dex 三种不同比例辅料的微针的成形性，有无断裂，弯曲。扫描电镜下考察针尖锋锐程度，针体表面光滑度，微观形态。

通过光学显微镜和扫描电镜观察最优处方下的 NANT-PTH-MNs，其形态见图 4，圆锥体阵列，针尖锋锐，针体表面光滑，微观形态良好。

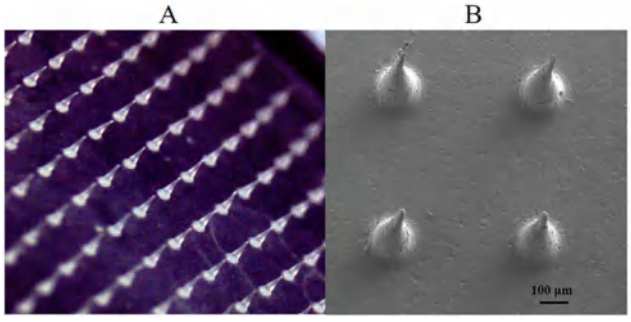


图 4　光学显微镜（A）和扫描电子显微镜（B）下微针的形态

Fig 4　Morphology of microneedles under optical microscope (A) and scanning electron microscope (B)

2.4　鼠皮机械性能考察

微针按压 SD 大鼠背部，5 min 后，处死大鼠，剥离背部皮肤，进行 HE 染色，观察微针穿刺情况。HE 染色结果见图 5，皮肤内形成了类圆锥体针孔形态，并且微针可以在皮肤表面形成清晰的微针孔径，为药物经皮递送提供通道。

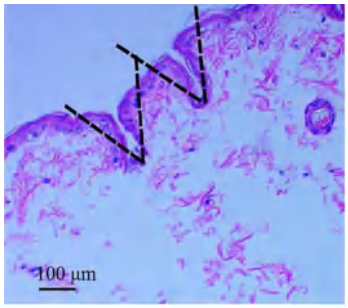


图 5　微针插入大鼠皮肤后的 HE 染色图

Fig 5　HE staining after microneedle insertion into rat skin

2.5　体外溶胀实验

将 NANT-PTH-MNs 置于 24 孔板中，加入 1 mL 超纯水，使针体浸没在水中。于 1、2、4、8、12、18、24、32、40、50、60、90、120、150、180 min 时将微针从 24 孔板内取出，擦去表面多余水分称定 [12]，考察微针溶胀情况。溶胀率（ESR，%）＝（W_t － W_0）/W_0×100%，其中 W_t 为 t 时刻微针的质量，W_0 为初始质量。

体外溶胀实验结果如图 6 所示，NANT-PTH-MNs 在 60 min 时溶胀率达到 180%，之后溶胀速率逐渐减小，趋于平缓，180 min 时溶胀率约 210%。微针吸水后发生溶胀，体积增大，由玻璃态转为水凝胶态，可为药物提供输送通道，使其进入皮肤内被吸收。

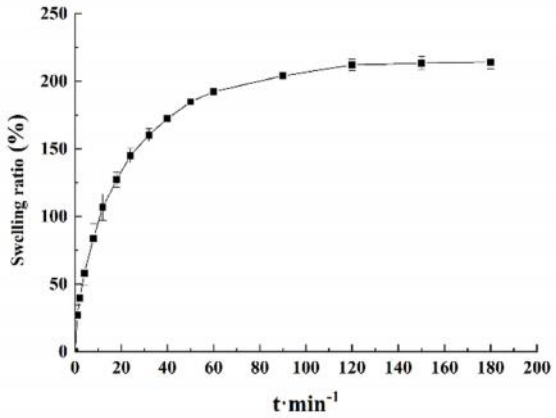


图 6　NANT-PTH-MNs 的溶胀率（n ＝ 3）

Fig 6　Swelling ratio of NANT-PTH-MNs (n = 3)

2.6　微针载药量考察

将 NANT-PTH-MNs 倒置于 2 mL PBS 中，使露出的针体浸没在溶液中，充分溶胀 24 h，HPLC 测 PBS 中 NANT 的含量。计算载药量，载药量（LC，%）＝（A － B）/C×100%，其中 A 是添加的 NANT 的总量，B 是 PBS 中游离的 NANT 的量，C 是载药微针的总重量。结果如表 1 所示，不同浓度的微针载药量相差不大，约为 23.4%，表明微针可以控制给药的剂量。

表 1　不同浓度 NANT-PTH-NMs 中 NANT 的载药量（n ＝ 6）

Tab 1　Drug loading of NANT in NANT-PTH-MNs at different concentrations (n = 6)

药物质量浓度 /（mg • mL $^{-1}$）	载药量 /μg
1.5	104.13±4.37
0.9	62.37±2.33
0.6	41.31±0.41

2.7　体外释放研究

取制备好的 NANT-PTH-MNs，在 24 孔板中加入 1.5 mL PBS，将微针倒置孔内使针体浸没在

PBS 中。将 24 孔板置恒温震荡培养箱内，37 ℃，转速为 100 r • min^{-1} 进行体外释放实验。于 0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12 h 取样，用 HPLC 对 NANT 含量测定，每次取样完成，需补加同体积的 PBS[13]。

体外释放结果如图 7 所示，不同剂量的微针中 NANT 的体外释放趋势基本一致，在 12 h 时的累积释放率均接近 85%。表明 NANT 在微针中的含量对其释放趋势和累积释放率的影响不大。进一步表明我们可以通过调整微针中药物含量来实现动物精准给药。

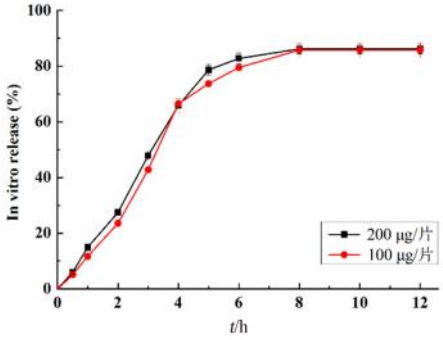


图 7 不同含药量微针的体外释放实验（n = 3）

Fig 7 In vitro release test of different drug contents in microneedles（n = 3）

2.8 体外透皮研究

将鼠皮固定在透皮扩散装置的扩散室与接收室之间[14]，用 NANT-PTH-MNs 对离体鼠皮施加一定力度，3 min 后用医用胶带固定。接收室中加入 12 mL PBS，使液面与皮肤完全接触，磁力搅拌速度设为 600 r • min^{-1}，（32±0.5）℃恒温水浴循环来模拟人体血液和组织液内循环。分别于 10 min、20 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、12 h 取接收液 0.5 mL，同时补加等体积接收液[15]，采用 HPLC 测定含量，绘制药物的累积渗透曲线。对照组选择相同剂量的 NANT 水溶液，其他步骤与微针给药组相同。

在体外透皮实验中，NANT-PTH-MNs 在 12 h 内累积渗透曲线如图 8 所示。前 20 min 内，NANT-PTH-MNs 中 NANT 的累积渗透率几乎为零。但在 30 min 后可以明显看到有部分 NANT 透过皮肤，3 h 时 NANT 的累积渗透率达到 50%，6 h 时达到将近 80% 左右。NANT 水溶液在 12 h 只有 10% 左右的渗透率。体外透皮实验表明微针可以明显增加 NANT 的皮肤渗透率，达到促进药物透皮吸收的目的。

2.9 NANT-PTH-MNs 的体内镇痛研究

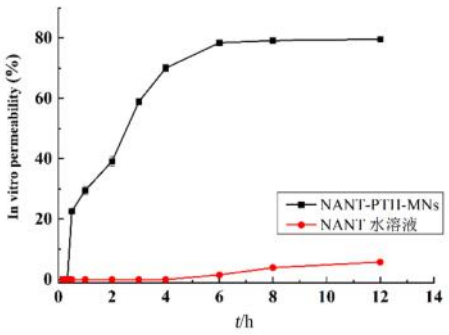


图 8 NANT-PTH-MNs 累积渗透曲线（n = 6）

Fig 8 In vitro penetration curve of NANT-PTH-MNs（n = 6）

使用热板法考察 NANT-PTH-MNs 的体内镇痛作用。取雌性小鼠若干，实验前记录小鼠进入热板仪（55.0±0.5）℃直至开始舔足需要的时间，确定小鼠痛阈值[16]。取 40 只雌性小鼠，随机分为空白组（生理盐水）、哌替啶（20 mg • kg^{-1}）组、NANT-PTH-MNs 高剂量组（120 μg • kg^{-1}）、NANT-PTH-MNs 低剂量组（60 μg•kg^{-1}）和 NANT 水溶液组（60 μg • kg^{-1}）。计算痛阈延长时间和痛阈提高百分率。

热板法结果如表 2 所示，与空白组相比，哌替啶组、NANT-PTH-MNs 高剂量组、NANT-PTH-MNs 低剂量组和 NANT 水溶液组给药后 1.5 h 均能明显延长小鼠的痛阈值（P < 0.05）。其中 NANT-PTH-MNs 高剂量组的痛阈值延长较长，与 NANT 水溶液组相比，镇痛效果较好（P < 0.05）。而 NANT-PTH-MNs 低剂量组的镇痛效果比 NANT 水溶液组稍差（P < 0.05）。与阳性对照哌替啶组比较，NANT-PTH-MNs 高剂量组的镇痛效果相当；NANT-PTH-MNs 低剂量组的镇痛效果不如哌替啶（P < 0.05）。表明制备的 NANT-PTH-MNs 具有镇痛疗效。

3 讨论

微针给药系统是目前研究较为火热的新型经皮给药制剂，经过多年的发展已被证明足够安全，特别是在疫苗、胰岛素等大分子药物的递送方面。

两种或两种以上的高分子材料混合而成的复合材料往往兼具两种高分子材料的性能，PVA 具有良好的韧性，一般与具有脆性的高分子材料如多糖合用，但要控制多糖在处方中的比例，否则会破坏水凝胶微针的网状结构。本课题选择的脆性材料是 Dex，经过对不同比例 PVA/Dex 混合溶液制备的微针的显微观察和鼠皮穿刺实验，初步筛选出 PVA/Dex 混合溶液的较优比例 84/16（W/W）。PTH-MNs 的释放药物机制是微针刺入皮肤

表 2　NANT-PTH-MNs 对小鼠热刺疼痛反应的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 2　Effect of micro-acupuncture on the pain response of spurs in mice ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

组别	给药前痛阈值 /s	给药后 1.5 h 痛阈值 /s	痛阈提高百分率 /%
空白组	17.23±1.38	17.44±1.35	—
哌替啶组	17.78±0.84	34.16±2.36*	92.13
NANT-PTH-MNs 高剂量组	19.84±1.06	36.88±2.12*▲	85.89
NANT-PTH-MNs 低剂量组	18.36±1.31	26.02±1.14*▲#	41.72
NANT 水溶液组	17.90±1.68	28.92±1.14*	61.56

注：与空白组比较，*$P<0.05$；与 NANT 水溶液组比较，▲$P<0.05$；与哌替啶组比较，#$P<0.05$。

Note：Compared with the blank group，*$P<0.05$；compared with the NANT aqueous solution group，▲$P<0.05$；compared with the piperidine group，#$P<0.05$.

内吸收组织间液，针体发生肿胀为药物输送提供了微孔道，因此本课题考察了微针溶胀的情况，结果表明其溶胀率可达到 200% 以上，说明制备的微针可以为药物的输送提供足够的空间通道。笔者对微针进行载药量的考察，不同浓度的微针载药量相差不大，说明微针可以携载足够 NANT 发挥镇痛效果。累积释放率的趋势图表明载不同药物剂量的微针在 12 h 的累积释放率均接近 85%，因此可以合理调整给药剂量，完成后期体内药效实验。体外透皮实验中对照组选择了等剂量的 NANT 水溶液，结果表明 NANT 水溶液在 12 h 内累积渗透率在 10%，而 NANT-PTH-MNs 在 8 h 达到了 80% 左右，表明微针可以刺破皮肤，提高 NANT 的皮肤渗透率。体内药效学实验表明 NANT-PTH-MNs 高、低剂量组均能延长小鼠的痛阈值，达到镇痛的疗效，为大分子药物微针透皮给药提供了新的思路和策略。

参考文献

[1] 陈汝筑，吴秀荣 . 眼镜蛇神经毒素的镇痛作用 [J]. 中国药理学通报，1988，4（2）：113-117.

[2] 金城，王海涛，肖小河，等 . 蛋白多肽类药物口服给药的研究进展 [J]. 解放军药学学报，2005，21（1）：51-53.

[3] Zhuang J，Rao F，Wu DM，et al. Study on the fabrication and characterization of tip-loaded dissolving microneedles for transdermal drug delivery [J]. Eur J Pharm Biopharm，2020，157：66-73.

[4] 张蓉，沈炎冰，苗晴晴，等 . 相转化水凝胶微针的制备和处方优化 [J]. 现代生物医学进展，2016，16（22）：4213-4216.

[5] 严琴英，文娇丽，翁嘉绮，等 . 石杉碱甲水凝胶微针的制备及经皮传递研究 [J]. 中草药，2021，52（12）：3530-3537.

[6] Tekko IA，Chen G，Domínguez-Robles J，et al. Development and characterisation of novel poly（vinyl alcohol）/poly（vinyl pyrrolidone）-based hydrogel-forming microneedle arrays for enhanced and sustained transdermal delivery of methotrexate [J]. Int J Pharm，2020，586：119580.

[7] 尹双青，吉民，姚日生 . Dex/PVA 复合凝胶的制备及其对辅酶 A 的控制释放 [J]. 东南大学学报（自然科学版），2011，41（6）：1330-1336.

[8] Chen X，Yu HJ，Wang L，et al. Cross-linking-density-changeable microneedle patch prepared from a glucose-responsive hydrogel for insulin delivery [J]. ACS Biomater Sci Eng，2021，7（10）：4870-4882.

[9] 窦学文 . 用于胰岛素透皮给药的相转化水凝胶微针点阵的制备 [D]. 上海：上海交通大学，2009.

[10] 韩珍 . 载胰岛素白及多糖可溶性微针柔性贴片的制备和初步评价 [D]. 成都：成都中医药大学，2021.

[11] Liu J，Li Q，Su Y，et al. Characterization and swelling-deswelling properties of wheat straw cellulose based semi-IPNs hydrogel [J]. Carbohydr Polym，2014，107：232-240.

[12] Indermun S，Choonara YE，Kumar P，et al. In vitro and in vivo evaluation of a hydrogel-based microneedle device for transdermal electro-modulated analgesia [J]. J Pharm Sci，2017，106（4）：1111-1116.

[13] Du HY，Liu P，Zhu JJ，et al. Hyaluronic acid-based dissolving microneedle patch loaded with methotrexate for improved treatment of psoriasis [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2019，11（46）：43588-43598.

[14] 马云淑，赵浩如，林以宁 . 葛根素及其磷脂复合物的体外透皮实验研究 [J]. 中国中药杂志，2000，25（5）：18-20.

[15] 刘巧洲，郭静，石磊，等 . 眼镜蛇毒因子抑制小鼠疼痛反应 [J]. 中国药理学通报，2019，35（5）：739-740.

[16] 聂红，沈映君，吴俊梅，等 . 白芷挥发油镇痛、镇静作用和身体依赖性研究 [J]. 中药新药与临床药理，2002，13（4）：221-223，269.

（收稿日期：2023-03-10；修回日期：2023-05-16）

基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的糖尿康胶囊的化学成分分析

胡静[1]，许建秦[2]，陈志永[1]，任慧[1]，张晓凤[2*]（1. 陕西省中医药研究院，西安 710061；2. 陕西省中医医院，西安 710003）

摘要：目的 采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱（UHPLC-Q-Orbitrap HRMS）技术快速识别和鉴定糖尿康胶囊中的化学成分。**方法** 采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 全面采集糖尿康胶囊的 MS^1 和 MS^2 碎片信息，快速鉴定其化学成分。采用 Thermo Accucure aQ C18 色谱柱（2.1 mm×150 mm，2.6 μm）进行分离，以甲醇（A）-0.1% 甲酸水溶液（B）为流动相进行梯度洗脱；加热电喷雾离子源（HESI）检测，正、负离子模式同时扫描获得高分辨质谱信息。**结果** 共鉴定出 74 个化学成分，包括有机酸及其酯类 26 个（氨基酸类 11 个、酚酸类 8 个、脂肪酸类 4 个和有机酸酯类 3 个）、生物碱类 8 个、黄酮类 9 个、苯乙醇类 7 个、核苷类 5 个、二苯乙烯苷类 1 个、皂苷类 3 个、香豆素类 3 个、蒽醌类 2 个、其他类化合物 10 个。其中 18 个化合物通过与对照品进行比较明确识别。**结论** UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术可以快速、全面地鉴定糖尿康胶囊中的化学成分，为提高其质量标准、阐明药效物质基础及临床合理用药提供重要依据。

关键词：糖尿康胶囊；轨道阱高分辨质谱；化学成分；氨基酸类；生物碱类；苯乙醇类；二苯乙烯苷类；核苷类；皂苷类

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1800-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.018

Chemical constituents in Tangniaokang capsules based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

HU Jing[1], XU Jian-qin[2], CHEN Zhi-yong[1], REN Hui[1], ZHANG Xiao-feng[2*] (1. *Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine*, *Xi'an* 710061; 2. *Shaanxi Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Xi'an* 710003)

Abstract: Objective To rapidly identify the chemical constituents of Tangniaokang capsules by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. **Methods** UPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to comprehensively collect MS^1 and MS^2 fragment information of Tangniaokang capsules to identify their chemical compositions. The gradient elution was performed on the Thermo Accucure aQ C18 column (2.1 mm×150 mm, 2.6 μm) with methanol (A) and water containing 0.1% formic acid (B) as the mobile phase. Positive and negative ion heated electrospray ion source (HESI) modes were used in the simultaneous sanning to obtain high-resolution mass spectrometric information. **Results** Totally 74 compounds were identified from Tangniaokang capsules, including 26 organic acids and esters (11 amino acids, 8 phenolic acids, 4 fatty acids and 3 organic esters), 8 alkaloids, 9 flavonoids, 7 phenylethanols, 5 nucleosides, 1 stilbene glycoside, 3 saponins, 3 coumarins, 2 anthraquinones and 10 other compounds. Among them, 18 compounds were easily identified as compared with the reference. **Conclusion** Chemical components in Tangniaokang capsules are identified rapidly and comprehensively with UPLC-Q-Orbitrap HRMS, which helps improve the quality standards, and elucidate the basis for

基金项目：陕西省科技厅重点产业链（群）项目（No. 2019ZDLSF04-07）。

作者简介：胡静，女，硕士，主管药师，主要从事中药质量控制与活性成分研究，email：huj668@163.com *通信作者：张晓凤，女，博士，主任医师，主要从事肾病的中西医结合诊治及基础研究，email：zxfeng02@aliyun.com

pharmacodynamic substances.

Key words: Tangniaokang capsule; orbitrap HRMS; chemical constituent; amino acid; alkaloid; phenylethanol; stilbene glycoside; nucleoside; saponin

糖尿康胶囊是陕西省中医医院（以下简称“我院”）多年来常用的院内制剂（陕药管制字 [2001] 第 0022 号），由西洋参、地黄、麦冬、天花粉、地骨皮、红花、制何首乌、僵蚕、鹿角霜等 9 味药材制成，具有滋阴益气，活血通络的功效，主治消渴病，对烦渴多饮、消瘦多尿、乏力多汗及肢体麻木疼痛等症效果较好 [1]。现代药理认为糖尿康胶囊可能通过激活 AMPK/CREB 信号通路改善 2 型糖尿病的胰岛素抵抗状态，减轻胰岛损伤 [2]。我院多年临床使用经验证明糖尿康胶囊临床疗效确切，但目前糖尿康胶囊的相关研究仅集中在临床应用和药理作用上 [1-2]，现行质量标准仅有西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的薄层色谱鉴别，缺乏对其化学成分全面系统的分析和鉴定研究。鉴于中药复方制剂成分复杂，仅对单一药材的薄层鉴定无法全面反映其质量和化学组成。因此，建立糖尿康胶囊化学成分的快速分析方法对该药的药效物质基础研究极为重要。

本研究采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱（UHPLC-Q-Orbitrap HRMS）技术全面分析、鉴定糖尿康胶囊的化学成分，现报道如下。

1 材料

UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 型高分辨质谱仪和 UltiMate3000 型超高效液相色谱系统 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司，配有加热电喷雾离子源（HESI）及 Xcalibur 4.0 工作站]，Thermo Accucore aQ RP18 色谱柱（2.1 mm×150 mm，2.6 μm，美国赛默飞世尔科技公司），SQP 型 1/1 万和 1/10 万电子分析天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]，KQ-100 型超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司）。

对照品瓜氨酸、拟人参皂苷 F11、丹皮酚、2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（中国食品药品检定研究院，批号分别为 110875-201607、110841-201607、110708-201407、MUST-16021005，纯度均≥ 98%）；对照品东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮乙素、咖啡酸（上海忻明生物科技有限公司，批号分别为 161208、18010202、18092803、17122804，纯度均≥ 98%）；对照品芦丁、地骨皮甲素、地骨皮乙素（四川省维克奇生物科技有限公司，批号分别为 wkq20030203、wkq22060905、wkq22050504，纯度均≥ 98%）；对照品 *N*- 反式 - 阿魏酰酪胺（上海源叶生物科技有限公司，批号：W01D9Z76497，纯度≥ 98%）；对照品毛蕊花糖苷、*L*- 精氨酸、*L*- 脯氨酸、*L*- 苯丙氨酸、*L*- 色氨酸、*L*- 亮氨酸、*L*- 异亮氨酸（宝鸡市辰光生物科技有限公司，批号分别为 61276-17-3、74-79-3、147-85-3、63-91-2、73-22-3、61-90-5、73-32-5，纯度均≥ 98%）。水（蒸馏水，广州屈臣氏食品饮料有限公司），甲醇（色谱纯）、甲酸（质谱纯）[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，其他试剂均为分析纯。糖尿康胶囊（规格：0.3 g/ 粒，批号：20211001，陕西省中医医院制剂中心）。

2 方法

2.1 液质联用分析条件

2.1.1 色谱条件 Thermo Accucore aQ RP18 色谱柱（2.1 mm×150 mm，2.6 μm），流动相甲醇（A）-0.1% 甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 3 min，0% ～ 2%A；3 ～ 5 min，2% ～ 5%A；5 ～ 8 min，5% ～ 10%A；8 ～ 18 min，10% ～ 30%A；18 ～ 30 min，30% ～ 60%A；30 ～ 40 min，60% ～ 90%A），流速 0.3 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 3 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源为 HESI，正、负离子监测模式，喷雾电压均为 3.5 kV，鞘气流速 40 arb，辅助气流速 10 arb，雾化温度 350 ℃，毛细管温度 320 ℃，S-lens RF level 为 50。扫描模式 Full MS/dd-MS^2，Full MS 分辨率 70 000，dd-MS^2 分辨率 17 500，扫描范围 *m/z* 80 ～ 1200；碰撞能量（CE）梯度为 30、50 eV。数据分析采用 Xcalibur 4.0 软件。

2.2 样品溶液的制备

取糖尿康胶囊内容物 20 粒，除去胶囊壳，研细，取约 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 乙醇 50 mL，常温下超声（功率为 250 W，频率为 50 kHz）提取 30 min，放冷，再称定重量，用 70% 乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3 对照品的制备

分别精密称取各对照品适量，置于 5 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，制备单一对照品储备液；混合对照品溶液储备液由各单一对照品储备液混合并稀释得到；置于 4 ℃冰箱保存。

2.4 数据处理

取糖尿康胶囊样品溶液，按“2.1”项下方法测定，根据一级质谱精确相对分子质量信息，采用 Xcalibur 4.0 软件拟合分子式，与自建的糖尿康胶囊化学成分数据库信息（包括中英文名称、CAS 号、分子式、精确相对分子质量）进行匹配，对色谱峰进行解析，根据自建数据库及参考文献等提供的碎片离子信息进一步推测化合物结构及其裂解规律。通过 Clog *P* 值（C 表示 calculated，*P* 为油水分配系数）判断极性，用来区分同分异构体。

3 结果与分析

借助 UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS 检测得到糖尿康胶囊的基峰色谱图，见图 1。按照“2.3”项下方法对糖尿康胶囊中的化学成分进行结构推测和确证。依据化合物的高分辨质谱数据，结合自建数据库、对照品、参考相关文献比对，最终从糖尿康胶囊中共解析出 74 个化学成分[3-10]，包括有机酸及其酯类 26 个（化合物 **1** ～ **3**、**5** ～ **7**、**12**、**13**、**15**、**18**、**24** 为氨基酸类；化合物 **17**、**22**、**23**、**25**、**28**、**32**、**35**、**36** 为酚酸类；化合物 **9**、**11**、**47**、**74** 为脂肪酸类；化合物 **34**、**71**、**72** 为有机酸酯类）、生物碱类 8 个（化合物 **4**、**19**、**30**、**38**、**43**、**50**、**52**、**58**）、黄酮类 9 个（化合物 **44**、**48**、**49**、**53**、**54**、**59**、**61**、**64**、**70**）、苯乙醇类 7 个（化合物 **39**、**40**、**42**、**45**、**46**、**55**、**57**）、核苷类 5 个（化合物 **8**、**10**、**14**、**20**、**21**）、二苯乙烯苷类 1 个（化合物 **41**）、皂苷类 3 个（化合物 **65**、**67**、**68**），香豆素类 3 个（化合物 **31**、**33**、**37**）、蒽醌类 2 个（化合物 **63**、**73**）、其他类 10 个（化合物 **16**、**26**、**27**、**29**、**51**、**56**、**60**、**62**、**66**、**69**）。其中，18 个化合物通过与对照品进行比较明确识别。鉴定结果见表 1。

3.1 有机酸及其酯类

在糖尿康胶囊中鉴定出有机酸及其酯类数量最多，共 26 种，主要来自于方中的白僵蚕、鹿角霜、天花粉、地黄等。本研究发现氨基酸类在正离子模式下有较好的响应，其余均在负离子模式下响应较好。裂解规律方面，氨基酸以丢失氨基和羧基碎片为主[11]。以化合物 **2** 为例，在正离子模式下的一级质谱信息得到准分子离子峰为 *m/z* 175.1190 $[M+H]^+$，分子式为 $C_6H_{14}N_4O_2$，二级碎片丢失氨基生成 *m/z* 158.0927 $[M+H\text{-}NH_2]^+$ 碎片离子，继续丢失羧基生成 *m/z* 116.0706 $[M+H\text{-}CHNO_2]^+$ 碎片离子；丢失 3 个氨基生成 *m/z* 130.0978 $[M+H\text{-}CH_5N_3]^+$ 碎片离子，经与对照品确认鉴定为 *L*-精氨酸，具体质谱裂解途径如图 2 所示。以化合物 **34** 为例，分子式为 $C_9H_{10}O_3$，二级碎片失去一分子 H_2O 得到 *m/z* 147.0449 $[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$ 碎片离子，丢失一分子 CO_2 得到 *m/z* 121.0292 $[M\text{-}H\text{-}CO_2]^-$ 碎片离子，失去一分子乙酸得到 *m/z* 93.0344 $[M\text{-}H\text{-}C_3H_6O_2]^-$ 苯酚碎片离子，推测该化合物为对羟基苯甲酸乙酯。同样，化合物 **23** 分子式为 $C_7H_6O_3$，二级碎片主要为 *m/z* 93.0344 $[M\text{-}H\text{-}CO_2]^-$ 丰度达到 100%，推测为对羟基苯甲酸。多元羧酸以化合物 **47** 为例，在负离子模式下其准分子离子峰为 *m/z* 187.0976 $[M\text{-}H]^-$，其二级碎片离子为 *m/z* 169.1007 $[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$，*m/z* 125.0969 $[M\text{-}H\text{-}H_2O\text{-}CO_2]^-$，根据裂解规律与文献[12]比对，推测其为壬二酸。

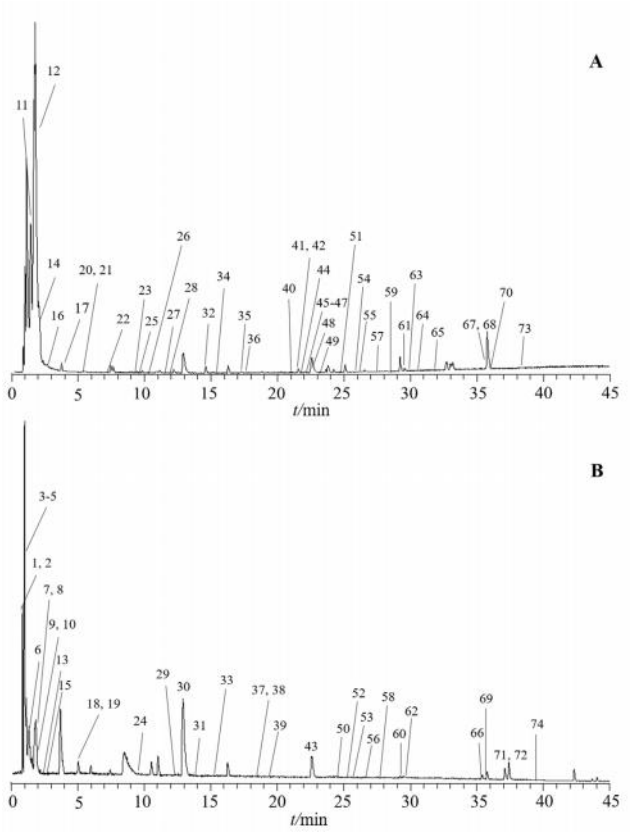


图 1 糖尿康胶囊在负离子（A）和正离子（B）模式下的基峰色谱图

Fig 1 Ion chromatogram in both negative ion（A）and positive ion（B）modes of Tangniaokang capsules

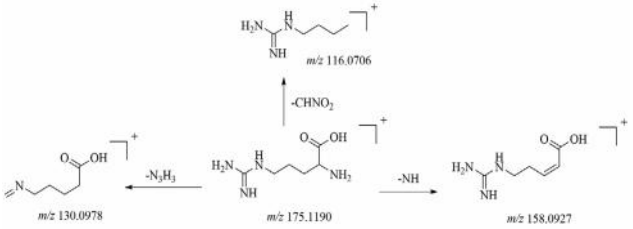


图 2 *L*-精氨酸的质谱裂解途径

Fig 2 MS fragmentation pathway of *L*-arginine

3.2 生物碱类化合物

糖尿康胶囊共鉴定 8 个生物碱类化合物，均来源于方中地骨皮，其中大部分生物碱为酰胺类化合

表 1 糖尿康胶囊化学成分的 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定

Tab 1 Identification of chemical constituents from Tangniaokang capsules by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

No.	分类	名称	分子式	t_R/min	*m/z* 理论值	*m/z* 实测值	δ/×10⁻⁶	离子模式	碎片离子
1	氨基酸类	赖氨酸[3-4]	$C_6H_{14}N_2O_2$	0.90	147.1128	147.1133	3.4	$[M+H]^+$	130.0862，84.0808
2	氨基酸类	*L-精氨酸[3-5]	$C_6H_{14}N_4O_2$	0.96	175.1190	175.1190	0.0	$[M+H]^+$	158.0927，130.0978，116.0706，70.0652
3	氨基酸类	*瓜氨酸[6]	$C_6H_{13}N_3O_3$	1.00	176.1030	176.1029	−0.6	$[M+H]^+$	159.0763，113.0709，70.0651
4	生物碱类	甜菜碱[7]	$C_5H_{11}NO_2$	1.00	118.0863	118.0862	−0.5	$[M+H]^+$	99.2821，72.6213，59.0732
5	氨基酸类	*L-脯氨酸[3-4]	$C_5H_9NO_2$	1.05	116.0706	116.0706	0.0	$[M+H]^+$	70.0652
6	氨基酸类	*L-异亮氨酸[3-4]	$C_6H_{13}NO_2$	1.11	132.1019	132.1021	1.4	$[M+H]^+$	86.0964，69.0700
7	氨基酸类	缬氨酸[3-4]	$C_5H_{11}NO_2$	1.14	118.0863	118.0862	−0.7	$[M+H]^+$	72.0808
8	核苷类	腺嘌呤[3-4]	$C_5H_5N_5$	1.64	136.0618	136.0619	0.7	$[M+H]^+$	118.9424，90.9475
9	脂肪酸类	柠檬酸[4]	$C_6H_8O_7$	1.76	191.0197	191.0195	−1.0	$[M-H]^-$	146.3258，111.0085，87.0085
10	核苷类	次黄嘌呤	$C_5H_4N_4O$	2.11	137.0458	137.0459	0.7	$[M+H]^+$	118.9423，90.9474
11	脂肪酸类	琥珀酸[6，8]	$C_4H_6O_4$	2.19	117.0193	117.0191	−1.7	$[M-H]^-$	99.0086，73.0293
12	氨基酸类	酪氨酸[3-4]	$C_9H_{11}NO_3$	2.24	182.0812	182.0812	0.0	$[M+H]^+$	136.0757，96.0444，87.0441
13	氨基酸类	*L-亮氨酸[3-4]	$C_6H_{13}NO_2$	2.39	132.1019	132.1021	1.4	$[M+H]^+$	86.0964
14	核苷类	黄嘌呤[3]	$C_5H_4N_4O_2$	2.56	151.0262	151.0259	−2.0	$[M-H]^-$	108.0201
15	氨基酸类	组氨酸[3-4]	$C_6H_9N_3O_2$	2.68	156.0768	156.0768	0.0	$[M+H]^+$	110.0710
16	其他类	邻苯三酚[8]	$C_6H_6O_3$	2.73	125.0244	125.0241	−2.4	$[M-H]^-$	125.0241，96.0453
17	酚酸类	没食子酸[9]	$C_7H_6O_5$	3.79	169.0143	169.0139	−2.4	$[M-H]^-$	125.0241
18	氨基酸类	*L-苯丙氨酸[3，4]	$C_9H_{11}NO_2$	5.04	166.0863	166.0862	−0.6	$[M+H]^+$	120.0807
19	生物碱类	*N*-乙酰基酪胺[7]	$C_{10}H_{13}NO_2$	5.04	180.1019	180.1017	−1.1	$[M+H]^+$	162.0910，133.0520，108.0444
20	核苷类	肌苷[3]	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	5.13	267.0735	267.0731	−1.5	$[M-H]^-$	135.0310
21	核苷类	鸟苷[3，7]	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	5.28	282.0844	282.0838	−2.1	$[M-H]^-$	150.0418，133.0154
22	酚酸类	原儿茶酸（3，4-二羟基苯甲酸）[8，10]	$C_7H_6O_4$	7.08	153.0193	153.0190	−2.0	$[M-H]^-$	109.0293
23	酚酸类	对羟基苯甲酸[8-9]	$C_7H_6O_3$	9.40	137.0244	137.0242	−1.5	$[M-H]^-$	93.0344
24	氨基酸类	*L-色氨酸[4]	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	9.62	205.0972	205.0974	1.0	$[M+H]^+$	188.0707，146.0601，118.0651
25	酚酸类	2，6-二羟基苯甲酸[8]	$C_7H_6O_4$	9.74	153.0193	153.0190	−2.0	$[M-H]^-$	109.0293
26	其他类	栀子新苷[10]	$C_{16}H_{22}O_{10}$	10.34	373.1140	373.1129	−2.9	$[M-H]^-$	325.0494，211.0612，167.0710，149.0605，123.0449
27	其他类	连翘酯苷 E[10]	$C_{20}H_{30}O_{12}$	11.48	461.1665	461.1669	0.9	$[M-H]^-$	315.1093，162.8387，135.0449，113.0242
28	酚酸类	龙胆酸[7，10]	$C_7H_6O_4$	11.96	153.0193	153.0190	−2.0	$[M-H]^-$	109.0293
29	其他类	对羟基苯甲醛[8]	$C_7H_6O_2$	12.19	123.0441	123.0441	0.0	$[M+H]^+$	105.0445，95.0491
30	生物碱类	*地骨皮乙素[7]	$C_{28}H_{42}N_4O_6$	12.93	531.3177	531.3181	0.8	$[M+H]^+$	293.1860，222.1125，165.0548，123.0440
31	香豆素类	*东莨菪苷[7]	$C_{16}H_{18}O_9$	13.99	355.1024	355.1024	0.0	$[M+H]^+$	193.0497，178.0264，165.0552，133.0285
32	酚酸类	*咖啡酸[7，10]	$C_9H_8O_4$	14.38	179.0350	179.0345	−2.8	$[M-H]^-$	135.0450
33	香豆素类	*秦皮乙素[10]	$C_9H_6O_4$	15.06	179.0339	179.0335	−2.2	$[M+H]^+$	152.0704，134.0598，108.0442
34	有机酸酯类	对羟基苯甲酸乙酯[8]	$C_9H_{10}O_3$	15.40	165.0557	165.0549	−4.8	$[M-H]^-$	147.0449，121.0292，93.0344
35	酚酸类	阿魏酸[7，9]	$C_{10}H_{10}O_4$	17.21	193.0506	193.0502	−2.1	$[M-H]^-$	177.9034，149.0241，121.0292
36	酚酸类	对羟基桂皮酸[9-10]	$C_9H_8O_3$	17.79	163.0401	163.0397	−2.5	$[M-H]^-$	119.0499
37	香豆素类	*东莨菪内酯[7]	$C_{10}H_8O_4$	18.68	193.0495	193.0497	1.0	$[M+H]^+$	178.0261，165.0541，133.0284
38	生物碱类	二氢咖啡酰酪胺[7]	$C_{17}H_{19}NO_4$	18.80	302.1387	302.1377	−3.3	$[M+H]^+$	138.0911，121.0645
39	苯乙醇类	高香茅醇[10]	$C_9H_{12}O_3$	19.36	169.0859	169.0864	3.0	$[M+H]^+$	137.0599，109.0649，91.0539
40	苯乙醇类	焦地黄苯乙醇苷 A1[10]	$C_{36}H_{48}O_{20}$	21.02	799.2666	799.2661	−0.6	$[M-H]^-$	623.2178，519.9864，428.0882，193.0498，175.0395，160.0162，132.0212
41	二苯乙烯苷类	*2，3，5，4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷[8]	$C_{20}H_{22}O_9$	21.47	405.1191	405.1183	2.0	$[M-H]^-$	243.0656，225.0555，173.0603，137.0243，109.0292
42	苯乙醇类	连翘酯苷 A[10]	$C_{29}H_{36}O_{15}$	22.08	623.1981	623.1973	−1.3	$[M-H]^-$	461.1654，315.1082，161.0240，133.0292，113.0242
43	生物碱类	*N*-对香豆酰真蛸胺或反式-*N*-对羟基苯乙基咖啡酰胺[7]	$C_{17}H_{17}NO_4$	22.64	300.1230	300.1233	1.0	$[M+H]^+$	163.0391，121.0648
44	黄酮类	异槲皮苷[6]	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22.80	463.0882	463.0882	0.0	$[M-H]^-$	301.0346，271.0249，255.0298，243.0293，165.9904，139.0033

续表 1

No.	分类	名称	分子式	t_R/min	*m/z* 理论值	*m/z* 实测值	δ/×10⁻⁶	离子模式	碎片离子
45	苯乙醇类	焦地黄苯乙醇苷 B1[10]	$C_{37}H_{50}O_{20}$	23.13	813.2823	813.2815	−1.0	[M-H]⁻	637.2333，448.8994，193.0505，175.0395，160.0162，134.0373
46	苯乙醇类	*毛蕊花糖苷 [10]	$C_{29}H_{36}O_{15}$	23.64	623.1981	623.1973	−1.3	[M-H]⁻	461.1660，315.1082，161.0240，133.0292，113.0242
47	脂肪酸类	壬二酸 [7]	$C_9H_{16}O_4$	23.81	187.0976	187.0972	−2.1	[M-H]⁻	169.1007，125.0969，97.0657
48	黄酮类	金丝桃苷 [8]	$C_{21}H_{20}O_{12}$	23.94	463.0882	463.0882	0.0	[M-H]⁻	301.0346，271.0249，243.0293
49	黄酮类	*芦丁 [8, 9]	$C_{27}H_{30}O_{16}$	24.07	609.1461	609.1449	−2.0	[M-H]⁻	301.0334，271.0241，255.0293，243.0292，227.0348，178.9981，151.0034，133.0284
50	生物碱类	*N-反式-阿魏酰酪胺 [7]	$C_{18}H_{19}NO_4$	24.80	314.1387	314.1387	0.0	[M+H]⁺	177.0547，145.0285，121.0648
51	其他类	2，5-二甲基-7-羟基色酮 [8]	$C_{11}H_{10}O_3$	24.89	189.0557	189.0553	−2.1	[M-H]⁻	164.0350，146.0245，120.0452
52	生物碱类	枸杞素 A[7]	$C_{42}H_{51}N_9O_{12}$	25.09	874.3730	874.3730	0.0	[M+H]⁺	486.1982，468.1875，226.1189，169.0759，136.0757，91.0545，70.0652
53	黄酮类	山柰酚-3-*O*-芸香糖苷或红花黄色素 A[9]	$C_{27}H_{30}O_{15}$	25.81	595.1657	595.1661	0.7	[M+H]⁺	287.0551
54	黄酮类	山柰酚-3-*β*-*D*-葡萄糖苷 [8]	$C_{21}H_{20}O_{11}$	25.95	447.0933	447.0918	−3.4	[M-H]⁻	285.0394，227.0351，136.9876
55	苯乙醇类	地黄苷 [10]	$C_{31}H_{40}O_{15}$	26.06	651.2294	651.2287	−1.1	[M-H]⁻	475.1812，323.7600，193.0499，175.0396，160.0162，134.0371
56	其他类	*丹皮酚 [9]	$C_9H_{10}O_3$	26.65	167.0703	167.0705	1.2	[M+H]⁺	149.0495，120.0805，84.9595
57	苯乙醇类	异地黄苷 [10]	$C_{31}H_{40}O_{15}$	27.56	651.2294	651.2287	−1.1	[M-H]⁻	475.1817，335.8453，193.0503，175.0397，160.0162，134.0372
58	生物碱类	枸杞素 B[7]	$C_{44}H_{52}N_{10}O_{11}$	27.86	897.3890	897.3893	0.3	[M+H]⁺	486.1985，468.1875，226.1189，188.0707，169.0760，159.0917，70.0652
59	黄酮类	山柰素 [8-9]	$C_{16}H_{12}O_6$	28.74	299.0561	299.0565	1.3	[M-H]⁻	284.0322，240.0412，143.4504，130.0874，94.9247
60	其他类	去氧齐墩果酸 [5]	$C_{30}H_{48}O_2$	29.21	441.3727	441.3734	1.6	[M+H]⁺	423.3617，203.1793，161.1321，133.1014，121.1012
61	黄酮类	牡荆素 [8]	$C_{21}H_{20}O_{10}$	29.56	431.0984	431.0976	−1.9	[M-H]⁻	269.0450，225.0553
62	其他类	5-羧甲基-7-羟基-2-甲基色原酮 [8]	$C_{10}H_8O_3$	29.57	177.0546	177.0547	0.6	[M+H]⁺	149.0235，121.0285，84.9597
63	蒽醌类	大黄素甲醚-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷 [8]	$C_{22}H_{22}O_{10}$	30.02	445.1140	445.1128	−2.7	[M-H]⁻	401.0872，357.0974，225.0556，181.0659，121.0293
64	黄酮类	山柰酚 [8-9]	$C_{15}H_{10}O_6$	30.51	285.0405	285.0397	−2.8	[M-H]⁻	241.0503，226.0257，166.2229
65	皂苷类	*拟人参皂苷 F11[5]	$C_{42}H_{72}O_{14}$	31.90	799.4849	799.4835	−1.8	[M-H]⁻	653.4249，635.4146，491.3812
66	其他类	路路通醛	$C_{30}H_{46}O_2$	35.23	439.3571	439.3572	0.2	[M+H]⁺	203.1797，191.1797，161.1326，147.1168，133.1012，119.0858
67	皂苷类	西洋参皂苷 R1[5]	$C_{56}H_{94}O_{24}$	35.36	1149.6062	1149.6055	−0.6	[M-H]⁻	1107.5924，1089.5840，945.5437，221.0622，161.0449，113.0242，101.0242
68	皂苷类	人参皂苷 Rb1[5]	$C_{54}H_{92}O_{23}$	35.76	1107.5957	1107.5933	−2.2	[M-H]⁻	945.5399，783.4918，621.4348，459.3833，375.2833，221.0663
69	其他类	白桦脂醇 [5]	$C_{30}H_{50}O_2$	35.77	443.3884	443.3885	0.2	[M+H]⁺	425.3757，221.1905，207.1744，189.1636，163.1481，135.1169
70	黄酮类	原花青 [8]	$C_{30}H_{26}O_{13}$	36.04	593.1301	593.1324	3.9	[M-H]⁻	209.0451，121.0292
71	有机酸酯类	邻苯二甲酸二丁酯 [5-6]	$C_{16}H_{22}O_4$	37.11	279.1591	279.1592	0.4	[M+H]⁺	149.0234
72	有机酸酯类	邻苯二甲酸二异丁酯 [5-6]	$C_{16}H_{22}O_4$	37.39	279.1591	279.1592	0.4	[M+H]⁺	149.0234
73	蒽醌类	大黄素或芦荟大黄 [8-9]	$C_{15}H_{10}O_5$	38.22	269.0456	269.0450	−2.2	[M-H]⁻	241.0507，225.0552，197.0604，131.6569
74	脂肪酸类	亚麻酸 [7]	$C_{18}H_{30}O_2$	38.76	279.2319	279.2317	−0.7	[M+H]⁺	149.0233，109.1033，95.0855，81.0699，67.0544

注（Note）：*通过与对照品比对确认（*means confirmed by comparison of reference substance）。

物，该类化合物在正离子模式下酰胺键极易断裂。以化合物 **30** 为例，正离子模式下准分子离子峰为 *m/z* 531.3177 $[M+H]^+$，保留时间为 12.93 min，其二级碎片离子为酰胺键断裂得到 *m/z* 293.1860 [M +

H-$C_{12}H_{18}N_2O_3$]$^+$，*m/z* 165.0548 [M＋H-$C_{19}H_{34}N_4O_3$]$^+$，经与对照品确认为地骨皮乙素。化合物 **38** 其在正离子模式下准分子离子峰为 *m/z* 302.1387 [M＋H]$^+$，高分辨质谱拟合其化学式为 $C_{17}H_{19}NO_4$，正离子模式下酰胺键断裂未出现脱去酪胺分子的离子峰，推测咖啡酰双键被还原后，无法通过共轭来稳定羰基碳上的正电荷，进一步脱去 CO 的离子峰 *m/z* 121.0645 [M ＋ H-$C_9H_{11}NO_3$]$^+$的丰度达到 100%。此外，酰胺键断裂后失去咖啡酰片段的碎片离子 *m/z* 138.0911 [M ＋ H-$C_9H_8O_3$]$^+$在二级质谱图上同样具有较高的丰度。故推测化合物 **38** 为二氢咖啡酰酪胺，推测其裂解过程见图 3。

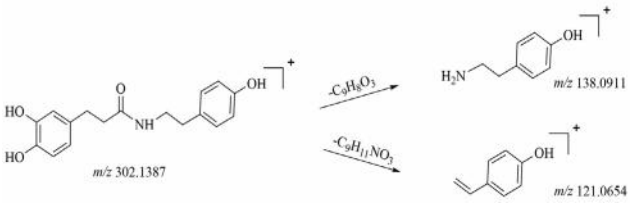


图 3　二氢咖啡酰酪胺的质谱裂解途径

Fig 3　MS fragmentation pathway of dihydro-*N*-caffeoyl tyramine

3.3　黄酮类化合物

糖尿康胶囊中鉴别的黄酮类化合物共有 9 个，主要来自方中红花和制何首乌。该类化合物是以 2 个苯环（A 与 B 环）通过 3 个碳原子互相联结形成的 2- 苯基色原酮为骨架衍生的一类广泛存在于自然界的化合物，根据是否连接糖残基，可分为黄酮苷元和黄酮苷类 [13]。黄酮苷类以 C- 苷键和 O- 苷键分为黄酮碳苷和黄酮氧苷。黄酮碳苷多以糖环的交叉环切除裂解为主，几乎不产生苷元离子；黄酮氧苷的裂解以糖苷键的断裂为主，丢失中性葡萄糖基或鼠李糖基等特征碎片，得到丰度较高的二级苷元碎片，丢失糖基的黄酮苷元可继续丢失 H_2O、CH_3、CO 等碎片或黄酮苷元 C 环发生逆 Diels-Alder 重排（RDA 重排）[14]。以化合物 **49** 为例，在负离子模式下的一级质谱信息得到准分子离子峰为 *m/z* 609.1461 [M-H]$^-$，保留时间为 24.07 min，其二级质谱脱去芦丁糖残基得到 100% 丰度的 *m/z* 301.0334 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$]$^-$特征碎片，为化合物 **49** 的黄酮苷元。黄酮苷元 C 环进一步裂解得到 *m/z* 271.0241 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$-CH_2O]$^-$，*m/z* 255.0293 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$-CH_2O_2]$^-$，*m/z* 178.9981 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$-$C_7H_6O_2$]$^-$碎片，或经 RDA 重排得到 *m/z* 151.0034 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$-]$^-$和 *m/z* 133.0284 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$-]$^-$碎片。碎片 *m/z* 271.0241 和 *m/z* 255.0293 丢失中性 CO 离子得到 *m/z* 243.0292 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$-CH_2O-CO]$^-$ 和 227.0348 [M-H-$C_{12}H_{20}O_9$-CH_2O_2-CO]$^-$碎片。经对照品确认，推测化合物 **49** 为芦丁。具体推测裂解过程见图 4。

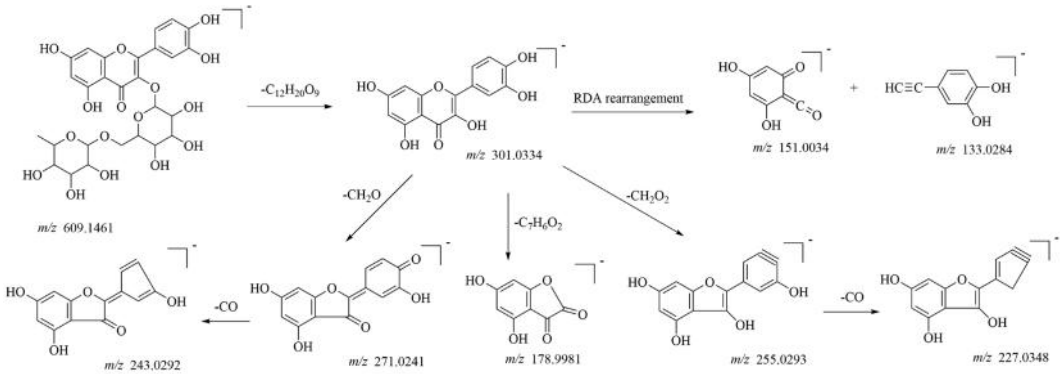


图 4　芦丁的质谱裂解途径

Fig 4　MS fragmentation pathway of rutin

3.4　二苯乙烯苷类化合物

化合物 **41** 是方中制何首乌中最主要的二苯乙烯苷类化合物，在糖尿康胶囊中也大量存在，已在糖尿康胶囊质量标准提升研究中纳入含量测定。化合物 **41** 在负离子模式下的一级质谱信息得到准分子离子峰为 *m/z* 405.1191 [M-H]$^-$，保留时间为 21.47 min，其二级质谱脱去一个葡萄糖残基得到一个二苯乙烯苷元碎片 *m/z* 243.0656 [M-H-Glc]$^-$，通过重排为醌式结构后进一步裂解形成 *m/z* 225.0555 [M-H-Glc-H_2O]$^-$，*m/z* 173.0603 [M-H-C_3H_2O2]$^-$，*m/z* 137.0243 [M-H-C_7H_6O]$^-$，*m/z* 109.0292 [M-H-$C_8H_6O_2$]$^-$，与文献报道基本一致 [15]。经对照品确认，化合物 **41** 为 2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷，具体推测裂解过程见图 5。

3.5　苯乙醇类化合物

糖尿康胶囊中有 7 个苯乙醇类化合物，均来自于方中地黄，除化合物 **39** 外其结构中均有苯乙醇苷元、咖啡酸及糖结构，其裂规律主要为糖苷键断裂和酯苷键断裂 [16]。以化合物 **46** 为例，在负离子模式下准分子离子峰为 *m/z* 623.1981 [M-H]$^-$，

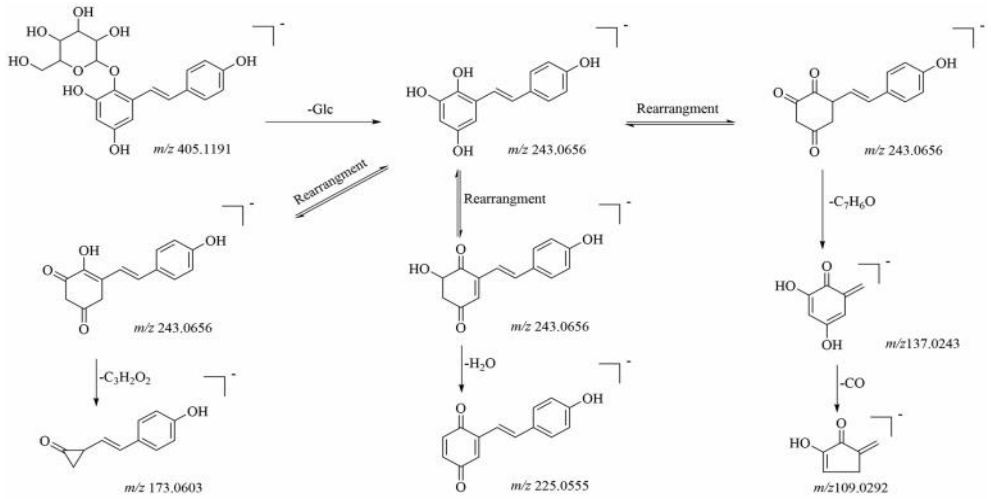


图 5 2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷的质谱裂解途径

Fig 5 MS fragmentation pathway of 2，3，5，4'-tetrahydroxy stilbene-2-*O*-*β*-*D*-glucoside

其二级质谱失去咖啡酰基得到 *m/z* 461.1660 [M-H-caffeoyl]$^-$碎片，继续丢失鼠李糖残基得到碎片 *m/z* 315.1082 [M-H-caffeoyl-Rha]$^-$，咖啡酸脱去一分子 H_2O 的 *m/z* 161.0240 [caffeoyl-H-H_2O]$^-$碎片。该裂解特征与文献报道一致[16]，且经对照品确认化合物 **46** 为毛蕊花糖苷。具体推测裂解过程见图 6。

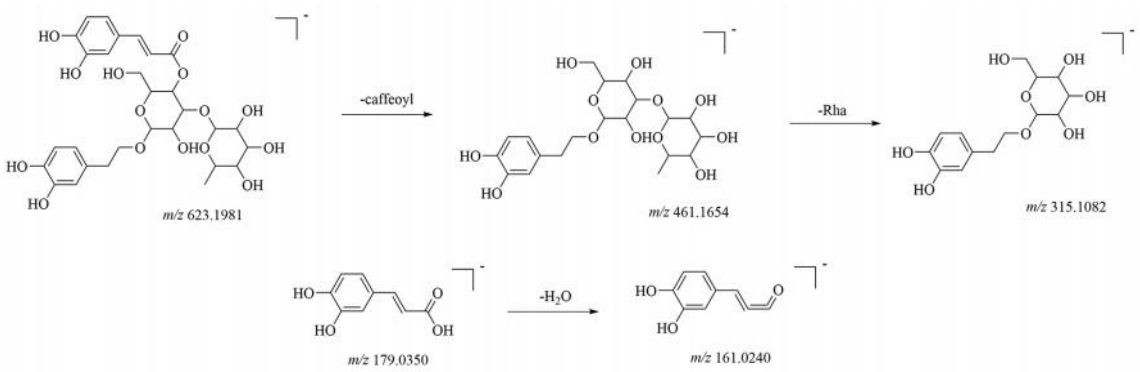


图 6 毛蕊花糖苷的质谱裂解途径

Fig 6 MS fragmentation pathway of acteoside

3.6 核苷类化合物

在糖尿康胶囊中共鉴定出 5 个核苷类化合物，主要来源于方中地黄及动物类药僵蚕和鹿角霜。核苷类化合物的质谱裂解规律主要为丢失核糖以及碱基母核的进一步裂解[17]。以化合物 **20** 为例，在负离子模式下准分子离子峰为 *m/z* 267.0735 [M-H]$^-$，其二级质谱失去核糖后得到一个丰度为 100% 的碎片离子 *m/z* 135.0310 [M-H-Ribose]$^-$，经推测其为肌苷。同样，化合物 **21** 一级质谱准分子离子峰为 *m/z* 282.0844 [M-H]$^-$，丢失糖基得到 *m/z* 150.0418[M-H-Ribose]$^-$，继续丢失氨基得到 *m/z* 133.0154 [M-H-Ribose-NH_3]$^-$碎片，推测其为鸟苷，具体质谱推测裂解途径见图 7。

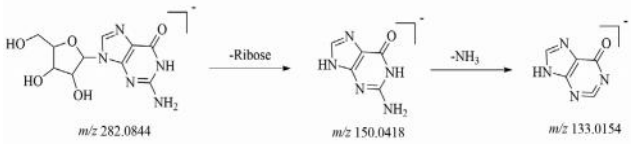


图 7 鸟苷的质谱裂解途径

Fig 7 MS fragmentation pathway of guanosine hydrate

3.7 皂苷类化合物

糖尿康胶囊中鉴定的皂苷类化合物只有 3 个，均来自于方中西洋参。皂苷类化合物的质谱裂解规律为糖丢失的过程及苷元的进一步裂解[18]。以化合物 **65** 为例，其保留时间为 31.90 min，在负离子模式下准分子离子峰为 *m/z* 799.4849 [M-H]$^-$，高分辨质谱拟合其分子式为 $C_{42}H_{72}O_{14}$，初步推测该化合物可能为拟人参皂苷 F11 或人参皂苷 Rb_1。二级质谱依次失去鼠李糖和葡萄糖后得到 *m/z* 653.4249 [M-H-Rha-H_2O]$^-$，*m/z* 635.4146 [M-H-Rha-2H_2O]$^-$，*m/z* 491.3812 [M-H-（Rha-H_2O）-（Glc-H_2O）]$^-$碎片离子。经推测其结构中分别有一分子的葡萄糖和一分子的鼠李糖，其皂苷元为奥寇梯木醇型皂苷元，结合文献报道[17]与对照品确认推测该化合物为拟人参皂苷 F11。具体质谱裂解途径见图 8。

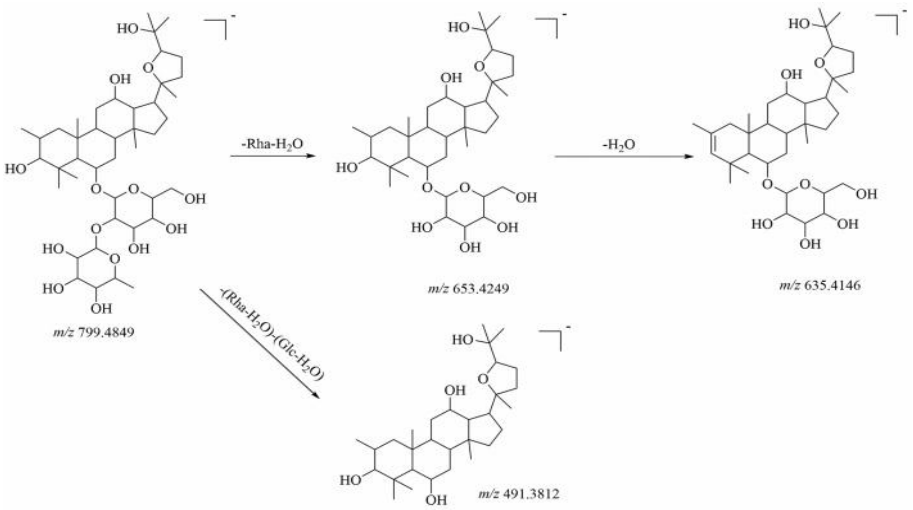


图 8 拟人参皂苷 F11 的质谱裂解途径

Fig 8 MS fragmentation pathway of pseudoginsenoside F11

3.8 蒽醌类化合物

糖尿康胶囊中蒽醌类化合物主要来自方中制何首乌。以化合物 **63** 为例，其一级质谱中准分子离子峰为 *m/z* 445.1140 $[M-H]^-$，进一步失去一分子 CO 和一分子 CH_3 得到大黄素甲醚的特征性碎片 *m/z* 401.0872 $[M-H-CO-CH_3]^-$，继续失去葡萄糖残基得到 *m/z* 225.0556 $[M-H-CO-CH_3-Glc]^-$；或特征性碎片 *m/z* 401.0872 $[M-H-CO-CH_3]^-$进一步失去一分子 CO_2 再失去葡萄糖残基得到 *m/z* 357.0974 $[M-H-CO-CH_3-CO_2]^-$ 和 *m/z* 181.0659 $[M-H-CO-CH_3-CO_2-Glc]^-$。参考相关文献 [19]，推测化合物 **63** 为大黄素甲醚 -8-*O*-*β*-*D* 葡萄糖苷，其详细质谱裂解途径见图 9。

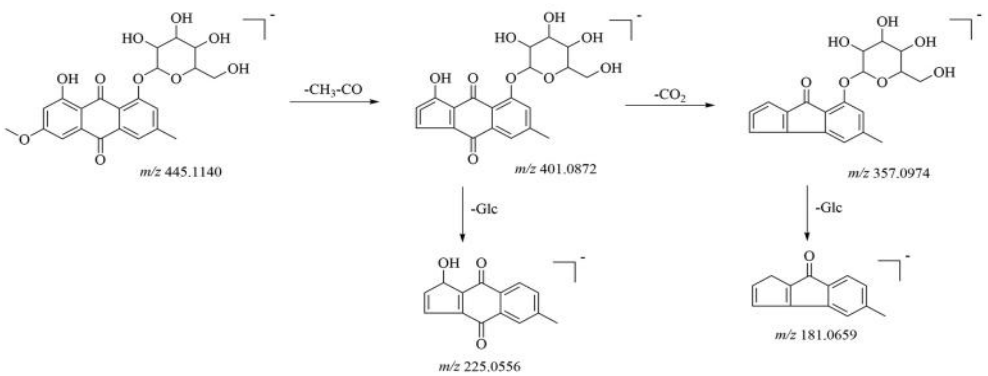


图 9 大黄素甲醚 -8-*O*-*β*-*D* 葡萄糖苷的质谱裂解途径

Fig 9 MS fragmentation pathway of physcion-8-*O*-*β*-*D*-glucoside

3.9 香豆素类化合物

糖尿康胶囊中 3 个香豆素化合物为方中地骨皮和地黄中成分。化合物 **31** 一级质谱中准分子离子峰为 *m/z* 355.1024 $[M+H]^+$，二级质谱失去一个葡萄糖残基得到碎片 *m/z* 193.0497 $[M+H-Glc-H_2O]^+$，继续失去一个甲基得到碎片 *m/z* 178.0264 $[M+H-Glc-CH_3]^+$；或碎片 *m/z* 193.0497 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$脱羧后再脱去一个氧离子得到碎片 *m/z* 133.0285 $[M+H-Glc-H_2O-COO-O]^+$；或碎片 *m/z* 193.0497 $[M+H-Glc-H_2O]^+$失去一个羰基形成特征碎片 *m/z* 165.0552 $[M+H-Glc-H_2O-CO]^+$。化合物 **37** 的一级质谱准分子离子峰为 *m/z* 193.0497 $[M+H]^+$，推测其为化合物 **31** 脱去葡萄糖残基后的苷元，经裂解依次得到 *m/z* 178.0264 $[M+H-CH_3]^+$、*m/z* 165.0552 $[M+H-CO]^+$、*m/z* 133.0285 $[M+H-COO-O]^+$ 等特征碎片。化合物 **33** 一级质谱中准分子离子峰为 *m/z* 179.0339 $[M+H]^+$，在二级质谱中，失去一个羰基得到 *m/z* 152.0704 $[M+H-CO]^+$，苯环上相邻的羟基缩合脱水形成特征碎片 *m/z* 134.0598 $[M+H-CO-H_2O]^+$。结合文献报道 [20] 及与对照品比对，确认化合物 **31**、**33**、**37** 为东莨菪苷、秦皮乙素、东莨菪内酯。

3.10 其他类化合物

糖尿康胶囊中除上述类型化合物外，还有萜类、酚类、色原酮类等化合物，具体见表 1。

4 讨论与结论

结合前期建立糖尿康胶囊化学成分库和预试验结果，最终选用 70% 乙醇超声提取 30 min，采用甲醇 -0.1% 甲酸水溶液为流动相，可以改善化合物的峰形。UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术以其高灵敏度、高分辨率、数据快速分析等优点成为中药小分子化合物复杂成分分析的重要手段。为全面鉴定糖尿康胶囊的化学成分，本试验采用正、负离子两种质谱扫描模式进行扫描和采集数据，结果表明豆素类、生物碱类、氨基酸类及其他类中的二苯乙烯苷类化合物等在正离子扫描模式下有较好的响应；除氨基酸类之外的有机酸类及黄酮类、核苷类、皂苷类等化合物在负离子扫描模式下有较好的响应。

本试验采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对糖尿康胶囊主要化学物质基础进行研究，共鉴定了 74 个化学成分，主要为有机酸及其酯类、生物碱类、黄酮类、苯乙醇类、核苷类、二苯乙烯苷类等成分。现代药理研究表明，氨基酸可防止细胞的氧化和炎症，能够预防糖尿病的发展 [21]；黄酮类化合物的降糖作用主要是通过调节脂质代谢紊乱，减轻胰岛素抵抗，提高葡萄糖利用率来维持体内葡萄糖稳态 [22-23]；其他如生物碱类、皂苷类、苯乙醇类等化学成分均有文献报道具有降糖的功效 [24-25]。因此，糖尿康胶囊是通过多成分、多途径、多靶点治疗 2 型糖尿病。但本试验中未鉴别出归属于方中麦冬药材的化学成分，后续研究中将会进一步优化糖尿康胶囊的制备工艺和分析方法。

糖尿康胶囊作为一个中药复方制剂，多药材多成分协作达到降血糖的功效，多年来临床疗效显著，但其药效物质基础却并不清楚。本研究采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术快速、精确并全面系统地对糖尿康胶囊的化学成分进行鉴别分析，在一定程度上弥补了现阶段对糖尿康胶囊成分研究的不足，为其质量标准提升及“成分 - 功效”相关试验研究提供了参考。

参考文献

[1] 许建秦，路波，沈璐，等 . 糖尿康胶囊治疗糖尿 300 例 [J]. 陕西中医，2000，21（3）：100.

[2] 袁秋贞，郑旭，甘雪峰，等 . 糖尿康胶囊通过 AMPK/CREB 信号通路治疗 2 型糖尿病作用研究 [J]. 陕西中医药大学学报，2018，41（1）：88-92.

[3] 关晴，赵海平，李春义 . 鹿角盘化学成分、药理作用及应用现状的研究进展 [J]. 特产研究，2018，40（4）：119-123.

[4] 李勇 . 九种动物药材氨基酸类成分分析 [D]. 大连：辽宁中医药大学，2018.

[5] 林红强 . 林下西洋参化学成分、抗 COPD 作用及新活性化合物药代动力学研究 [D]. 长春：吉林大学，2022.

[6] 许宏亮，李彦川，张雅琴，等 . 天花粉主要化学成分研究进展 [J]. 亚太传统医药，2018，14（5）：120-123.

[7] 陈靖枝，卢星，胡运琪，等 . 传统中药地骨皮化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志，2021，46（12）：3066-3075.

[8] 郭千祥 . 制何首乌化学成分及质量等级评价标准研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2020.

[9] 李馨蕊，刘娟，彭成，等 . 红花化学成分及药理活性研究进展 [J]. 成都中医药大学学报，2021，44（1）：102-112.

[10] 陈金鹏，张克霞，刘毅，等 . 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（6）：1772-1784.

[11] 陈剑，吴昊，刘润花，等 . 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析乌灵胶囊的化学成分 [J]. 中药材，2022，45（3）：639-646.

[12] Yu S，Liu H，Li K，et al. Rapid characterization of the absorbed constituents in rat serum after oral administrationand action mechanism of Naozhenning granule using LCMS and network pharmacology [J]. J Pharm Biomed Anal，2019，166：281-290.

[13] 李想 . 黄酮醇类化合物 ESI-ITMS^n 质谱裂解规律的量子化学研究 [D]. 佳木斯：佳木斯大学，2015.

[14] 吴新安，都模勤 . 黄酮碳苷类化合物 ESIMS-MS 裂解规律初探 [J]. 天然产物研究与开发，2011，23（6）：1085-1087.

[15] 徐文 . 液质联用技术在两种中药成分分析中的应用 [D]. 广州：广州中医药大学，2015.

[16] 史敏，任炳楠，吴茵 . UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析养心定悸胶囊中化学成分 [J]. 中药材，2022，45（4）：870-876.

[17] 周大炜，徐艳丽，吴俊丽 . 6 种罕见核苷糖电喷雾质谱裂解规律的初步研究 [J]. 药学学报，2012，47（3）：374-379，258.

[18] 杨琳，缪宇，殷惠军，等 . LC-ESI-MS^n 法鉴定心悦胶囊中西洋参皂苷类成分 [J]. 中草药，2010，41（12）：1942-1947.

[19] 刘梦娇，王云，李玲云，等 . 三黄片化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定分析 [J]. 中国中药杂志，2017，42（9）：1685-1692.

[20] 胡静，杨媛媛，任慧，等 . 光叶丁公藤中化学成分的 UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS 鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（18）：124-132.

[21] Mesgari-Abbasi M，Valizadeh H，Mirzakhani N，et al. Protective effects of di- and tri-peptides containing proline，glycine，and leucine on liver enzymology and histopathology of diabetic mice [J]. Arch Physiol Biochem，2022，128（1）：59-68.

[22] 朱晓丹，江冰洁，刘新元，等 . 天然产物中黄酮、多酚及生物碱类化合物治疗 2 型糖尿病研究进展 [J]. 中国现代中药，2019，21（11）：1592-1598.

[23] 赵雪巍，刘培玉，刘丹，等 . 黄酮类化合物的构效关系研究进展 [J]. 中草药，2015，46（21）：3264-3271.

[24] 汪悦，邬颖华 . 中药皂苷类化合物治疗糖尿病肾病研究进展 [J]. 亚太传统医药，2018，14（5）：114-117.

[25] 张科 . 中药降糖活性成分及作用机理研究进展 [J]. 云南中医中药杂志，2016，37（8）：83-86.

（收稿日期：2022-10-21；修回日期：2022-12-13）

替比培南匹酯颗粒的制备及体内外评价

赵伟，刘阿利，张贵民*，王现珍，韩美娟（鲁南贝特制药有限公司，药物新制剂研发山东省工程研究中心，山东 临沂　276000）

摘要：目的　制备替比培南匹酯颗粒并测定其体外溶出曲线，考察其在 Beagle 犬体内的药动学特征。**方法**　先用湿法制粒制备含药内核颗粒，再用流化床进行底喷包衣，考察不同包衣层（隔离层、掩味层、矫味层）增重对产品体外溶出的影响，确定各层最佳增重；采用正交实验法确定掩味层中各包衣组分（乙基纤维素水分散体、尤特奇 NE30、羟丙基甲基纤维素 E6）的最佳比例；以替比培南匹酯颗粒为参比制剂，进行体外溶出行为和 Beagle 犬体内药动学对比实验。**结果**　自制制剂和参比制剂体外溶出行为相似，在犬体内的 $AUC_{0\sim\infty}$、t_{max} 和 C_{max} 分别为（4678±652）和（4215±897）h • μg • L^{-1}、（1.5±0.55）和（1.17±0.41）h、（1838±179）和（1915±402）μg • L^{-1}，差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。以 $AUC_{0\sim t}$ 计算得自制制剂的相对生物利用度为（118.67±14.57）%。**结论**　本文研究出的替比培南匹酯颗粒处方工艺可行，质量稳定，与参比制剂相似，可为其仿制研究提供依据。

关键词：替比培南匹酯；湿法制粒；流化床底喷包衣；体外溶出；药动学
中图分类号：R94，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1809-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.019

Preparation and in vitro-in vivo evaluation of tebipenem pivoxil granules

ZHAO Wei, LIU A-li, ZHANG Gui-min*, WANG Xian-zhen, HAN Mei-juan (*Lunan Better Pharmaceutical Co., Ltd., Shandong Engineering Research Center for New Drug Pharmaceuticals Research &Development*, *Linyi Shandong* 276000)

Abstract: Objective　To prepare tebipenem pivoxil granules and determine its dissolution curve in vitro, then to investigate their pharmacokinetics in Beagle dogs. **Methods**　First, drug-containing core particles were prepared by wet granulation, and then coating was sprayed at the bottom of a fluidized bed. The effect of weight gain due to different coating layers (the isolation layer, taste-masking layer, and taste-correcting layer) on the in vitro dissolution of the product was istudied to determine the best weight of each layer. Orthogonal test was used to determine the best proportion of each coating component in the taste-masking layer (ethyl cellulose aqueous dispersion, Eudragit NE30, hypromellose E6). Tebipenem pivoxil granules were taken as the reference preparation, and the in vitro dissolution behavior and the pharmacokinetics in beagle dogs were compared. **Results**　The in vitro dissolution behavior of the self-made preparation and the reference preparation were similar. The $AUC_{0\sim\infty}$, t_{max} and C_{max} of the self-made and reference preparations in the dogs were (4678±652) and (4215±897) h • μg • L^{-1}, (1.5±0.55) and (1.17±0.41) h, (1838±179) and (1915±402) μg • L^{-1}, with no significant difference ($P > 0.05$). The relative bioavailability of the self-made preparations calculated by $AUC_{0\sim t}$ was (118.67±14.57)%. **Conclusion**　The formulation technology of tebipenem pivoxil granules in this paper is feasible, with stable quality, which is similar to that of the reference preparation, which can provide a basis for its imitation research.

Key words: tebipenem pivoxil; wet granulation; spray coating at the bottom of fluidized bed; in vitro dissolution; pharmacokinetics

作者简介：赵伟，女，硕士，工程师，主要从事新药研究及开发，email：weiy-246@163.com　*通信作者：张贵民，男，研究员，主要从事新药研究与开发，email：Lunanzhangguimin@163.com

培南类药物（碳青霉烯类）问世于 20 世纪 80 年代，是抗菌谱最广的一类非典型 β- 内酰胺类抗菌药物，具有抗菌谱广、抗菌活性强的特点，能有效解决头孢类抗菌药物的耐药性问题，且不良反应较少 [1-3]。目前对这类药物的研发非常热门，并且取得了很大进展，极具市场竞争力。替比培南匹酯（tebipenem pivoxil）最早由美国辉瑞公司研发 [4]，后日本明治制果制药公司研制开发了此药物的颗粒剂即替比培南匹酯颗粒 [5]。

替比培南匹酯颗粒作为儿童用抗菌药物制剂，对产品的口感及稳定性要求很高，原研产品通过降低原料药粒径来提高制剂的溶出度，采用包衣技术来掩盖药物的不良苦味，提高了儿童服用的顺应性。但粉末或颗粒包衣技术是 21 世纪新兴的高科技制剂技术 [6-7]，对生产设备及生产工艺要求非常严格，过程、工艺参数控制精细，实验室技术还处在发展研究阶段，工业化生产更难。本研究针对这一现状，采用传统的湿法制粒及流化床底喷包衣工艺，制得了符合质量要求的替比培南匹酯颗粒。探讨了处方、工艺因素对制剂体外溶出行为的影响，并通过 Beagle 犬药动学实验考察自制制剂和参比制剂在动物体内的药物吸收差异和相对生物利用度，为替比培南匹酯颗粒处方工艺优化、质量评价及提高提供一定的数据支持。

1 材料

Mini-CG 实验型湿法混合制粒机（创志科技股份有限公司），LBL-3 型流化床制粒包衣机（重庆市科旭制药机械设备制造有限公司），KT-50 多功能粉碎机 [雍义康科技（北京）有限公司]，Evolution300 紫外可见光分光光度计、TSQ Endurance MS（Thermo Fisher），UDT-812A-12 溶出实验仪（美国 Logan 公司），XS205 分析天平（精度：十万分之一，Mettler Toledo），Acquity UPLC（美国 Waters 公司），色谱柱（Agilent poroshell EC-C18 柱，50 mm×4.6 mm，2.7 μm），3K15 高速冷冻离心机（Sigma），DW-86W100 医用低温保存箱（青岛海尔特种电器有限公司）。

替比培南匹酯原料药（含替比培南 76.8%，批号：634181002，山东新时代药业有限公司），替比培南匹酯颗粒（参比制剂，规格：50 mg/袋，批号：ORPFM2107，日本明治制果制药公司），微晶纤维素（安徽山河药用辅料股份有限公司），羟丙基纤维素（Ashland Specialty Ingredients G.P.），蔗糖（漳州市漳福糖业有限公司），乙基纤维素水分散体（Nutrition & Biosciences USA 1，LLC），柠檬酸三乙酯（Morimura Bras），丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯（2∶1）共聚物（商品名：尤特奇 NE30，Evonik Rohm GmbH），羟丙基甲基纤维素 E6（JRS Pharma GmbH & Co.KG），滑石粉（广西龙胜华美滑石开发有限公司），阿司帕坦（日本味之素株式会社），胭脂红、日落黄 [森馨香精色素科技（中国）有限公司]；替比培南匹酯（对照品，自标，含替比培南 77.3%，批号：634181003）、替比培南（对照品，纯度：99.8%，批号：20181105）（山东新时代药业股份有限公司）；对乙酰氨基酚对照品（纯度：99.9%，批号：100018-201610，中国食品药品检定研究院）；3-*N*-吗啉基丙磺酸（MOPS，分析纯，玛雅试剂公司）；甲醇、乙腈、乙酸铵为色谱纯，水为纯化水。

SPF 级健康雄性 Beagle 犬 12 只，平均体质量约为 10 kg [北京玛斯生物技术有限公司，许可证编号 SCXK（京）20190001]；犬维持饲料（北京科奥协立饲料有限公司）。Beagle 犬在（25±2）℃、相对湿度 45% ～ 65%、光照和黑暗各为 12 h 的条件下饲养，自由饮食、饮水，适应性饲养 1 周后开始实验。

2 方法与结果

2.1 替比培南匹酯颗粒体外溶出度的测定

2.1.1 溶液的制备 pH 6.8 磷酸盐缓冲液：为考察产品的体外溶出与体内释放行为的相关性，选择 pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.0 或 4.5 磷酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液来模拟体内的消化道吸收环境。替比培南匹酯颗粒在 pH 1.2 盐酸溶液中溶出后迅速降解，且在 pH 4.0 磷酸盐缓冲溶液中 15 min 溶出度大于 85%[8-11]，所以本文以 pH 6.8 磷酸盐缓冲液作为考察溶出曲线的释放介质。磷酸二氢钾 1.7 g 和无水磷酸氢二钠 1.775 g，加水适量使溶解后，定容至 1000 mL，即得。

对照品溶液：取替比培南匹酯对照品适量，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液配制成约含替比培南 16 μg·mL^{-1} 的溶液。

样品溶液：取替比培南匹酯对照品适量（约相当于替比培南 50 mg）和处方比例的辅料，混匀，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 900 mL，搅拌使溶解，过滤，取续滤液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度，即得约含替比培南 16 μg·mL^{-1} 溶液，过滤。

空白溶液：取处方比例的辅料约 15 mg，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液至 100 mL，摇匀，过滤。

2.1.2 紫外吸收测定 分别取上述 4 种溶液，在

200 ～ 800 nm 的波长范围内进行紫外扫描，结果替比培南匹酯在 323 nm 处有最大吸收，且空白辅料不干扰本品的测定。

2.1.3　线性关系考察　精密称取替比培南匹酯约 20 mg，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液溶解并稀释制成约含替比培南 0.4 mg • mL^{-1} 的溶液，作为对照品储备液。分别精密量取 0.6、1、1.6、2、2.6、3.2 mL，各置 50 mL 量瓶中，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液定容，摇匀，作为系列对照品溶液；分别于 323 nm 处测定吸光度 A，并以质量浓度 c 为横坐标、以 A 为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程为 $A = 0.0334c - 0.0013$（$r = 0.9999$），结果替比培南线性范围为 4.83 ～ 25.76 μg • mL^{-1}。

2.1.4　精密度实验　精密移取“2.1.3”项下对照品储备液 2 mL 置 50 mL 量瓶中，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液定容，摇匀，作为对照品溶液，连续测定 6 次，计算得吸光度的 *RSD* 为 0.40%，提示方法精密度良好。

2.1.5　回收实验　精密称取替比培南匹酯对照品约 20 mg，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液溶解并稀释制成约含替比培南 0.4 mg • mL^{-1} 的溶液，作为替比培南匹酯对照品储备液。精密称取空白辅料约 180 mg（相当替比培南匹酯 20 mg），同法配制，作为空白辅料储备液。分别精密量取替比培南匹酯对照品储备液、空白溶液各 1、2、2.6 mL，各置同一 50 mL 量瓶中，用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液定容至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为低、中、高浓度回收率样品溶液。每个浓度配制 3 份。依法检测，计算得低、中、高浓度的平均回收率为 100.16%、99.73%、100.29%，*RSD* 为 0.60%、0.59%、0.97%。

2.1.6　体外溶出曲线的测定和相似因子的计算　照《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第二法（桨法）测定。以 pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质，在 37 ℃、转速 75 r • min^{-1} 条件下实验。分别于 5、10、15、20、30、45、60、90、120 和 180 min 时取出溶出液 10 mL，立即补充同温等量溶出介质，取出液过滤，取续滤液 3 mL 用溶出介质定量稀释至 10 mL，摇匀，在 323 nm 波长处测定吸光度，计算每个时间点的溶出率。平行测定 12 份，以时间为横坐标、溶出率为纵坐标，绘制溶出曲线。同法测定并绘制参比制剂的溶出曲线，比较自制样品和参比制剂的相似因子（f_2）。

2.2　替比培南匹酯颗粒的制备

2.2.1　替比培南匹酯颗粒内核颗粒的制备　5000 袋批量：先将替比培南匹酯原料药、蔗糖粉碎，过 180 μm 的筛网，备用。再将粉碎后的蔗糖 925 g、替比培南匹酯原料药 325.5 g（以替比培南计）、微晶纤维素 50 g、羟丙基纤维素 45 g 置制粒机中，搅拌速度 300 r • min^{-1}，切碎速度 700 r • min^{-1} 混合 5 min，加入无水乙醇制备湿颗粒。在颗粒成型后，将制粒机搅拌转速提高到 600 r • min^{-1}，切碎调至 100 r • min^{-1}，让湿颗粒在制粒机内进行滚圆 90 s。将湿颗粒转移至流化床中，先自然风吹 1 min，再用 425 μm 的筛网整粒，收集通过 425 μm 筛网的颗粒，再设定进风温度为 50 ℃，干燥 0.5 h，制得内核颗粒，备用。

2.2.2　包衣液的配制　隔离层：将 15 份的羟丙基甲基纤维素 E6 加入到适量水中，搅拌溶解后加入 2 份的滑石粉使分散均匀，配得固含量为 17% 的混合溶液，即得。

掩味层：先将柠檬酸三乙酯加入到乙基纤维素水分散体中搅拌 30 min 以上，待用；将处方量的羟丙基甲基纤维素 E6 加入到适量水中搅拌溶解后加入滑石粉使分散均匀，再将乙基纤维素水分散体和柠檬酸三乙酯的混合物加入到上述溶液中，搅拌均匀；最后将尤特奇 NE30 加入到上述溶液中，搅拌均匀，即得固含量为 18.6% 的包衣溶液。

矫味层：先将色素加入到适量水中，搅拌溶解，再加入 2 份羟丙基甲基纤维素 E6，搅拌溶解后加入 15 份蔗糖、5 份阿司帕坦、2 份滑石粉使溶解并分散均匀，即得固含量为 24% 的混合溶液。

2.2.3　底喷包衣　取“2.2.1”项下内核颗粒 400 g 加入流化床中，采用底喷包衣工艺，不同包衣层的工作参数均为：喷液转速 5 ～ 12 Hz，风机频率 12 ～ 24 Hz，进风温度 34 ～ 40 ℃，物料温度（30±5）℃，喷雾压力 0.15 ～ 0.25 MPa。先包隔离层，再包掩味层，最后包矫味层。包衣完成后，将颗粒于 40 ℃老化 12 h，即得。

照表 1 设计的增重制备，考察包衣层及其增重对产品体外溶出曲线的影响，筛选出每层包衣的最佳包衣增重，结果见图 1。

表 1　隔离层、掩味层、矫味层的包衣增重

Tab 1　Weight gains of isolation layer，taste-masking layer and taste-correcting layer

处方	隔离层增重 /%	掩味层增重 /%	矫味层增重 /%
1	10	30	30
2	30	30	10
3	30	10	30

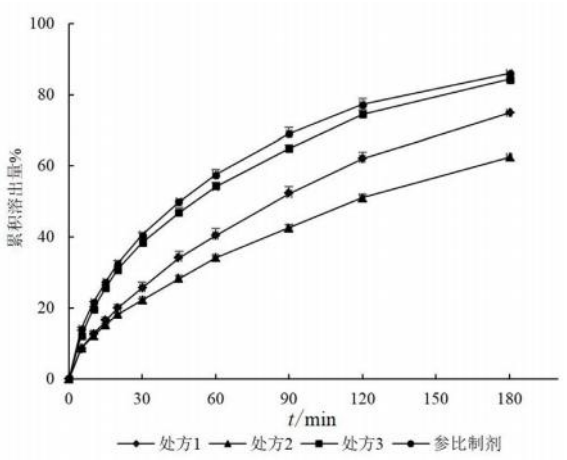


图 1 包衣层增重对替比培南匹酯颗粒溶出行为的影响（n = 12）

Fig 1 Effect of coating weight on the dissolution behavior of tebipenem pivoxil granules（n = 12）

结果表明，掩味层增重 30% 时较增重 10% 溶出慢，使得体外溶出行为与参比制剂差异较大（处方 1、2、3 与参比制剂的相似因子 f_2 分别为 43.6、35.6、78.0），说明掩味层增重是影响替比培南匹酯颗粒体外溶出行为的关键。初步确定替比培南匹酯颗粒隔离层、掩味层、矫味层最佳包衣增重分别为 30%、10%、30%。

2.2.4 掩味层各组分比例筛选 在处方 3 的基础上，按照表 2 采用三因素三水平正交实验筛选掩味层中乙基纤维素水分散体（A）、尤特奇 NE30（B）、羟丙基甲基纤维素 E6（C）的比例。其中，柠檬酸三乙酯的用量为乙基纤维素水分散体固含量的 24%，滑石粉用量为尤特奇 NE30 固含量 100%。包衣操作同 “2.2.3” 项下。测定各组样品在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的溶出曲线，并计算其与参比制剂的 f_2 值，以 f_2 值为评价指标确定各组分的最佳比例。结果见表 3 ～ 4。

表 2 因素水平

Tab 2 Factor and level

水平	因素		
	A/%	B/%	C/%
1	20	10	2.0
2	25	15	2.5
3	30	20	3.0

注：表中数据为各组分占掩味层包衣液总质量的比例。

Note：The data in the table are the proportion of each component in the total mass of the coating of the taste-masking layer.

结果表明：① 掩味层各组分对溶出曲线的影响次序为 C ＞ A ＞ B；② 羟丙基甲基纤维素 E6 的比例对溶出曲线有显著影响，结合相似因子 f_2 值，最优比例为 2.5；③ 乙基纤维素水分散体和尤特奇 NE30 对溶出曲线都有一定影响，但乙基纤维素水分散体影响更大；④ 确定掩味层包衣组分的最佳组成比例为：乙基纤维素水分散体 - 尤特奇 NE30- 羟丙基甲基纤维素 E6 ＝ 20∶15∶2.5。

表 3 正交实验结果

Tab 3 Orthogonal experiment

处方	A	B	C	D（误差项）	f_2 值
1	1	1	1	1	48.93
2	1	2	2	2	63.89
3	1	3	3	3	56.87
4	2	1	2	3	50.35
5	2	2	3	1	58.62
6	2	3	1	2	47.98
7	3	1	3	2	54.56
8	3	2	1	3	46.87
9	3	3	2	1	48.57
K_1	169.69	153.84	143.78	156.12	
K_2	156.95	169.38	162.81	166.43	T ＝ 476.64
K_3	150.00	153.42	170.05	154.09	CT ＝ 227185.69

表 4 方差分析

Tab 4 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	66.48	2	33.24	2.28	0.30
B	55.15	2	27.58	1.89	0.35
C	122.74	2	61.37	4.20	0.19
D（误差项）	29.18	2	14.60	1.00	—

2.3 验证实验

2.3.1 自制颗粒与参比制剂体外溶出行为的比较

采用相似因子 f_2 法评价自制制剂与参比制剂溶出曲线的相似性。本实验选取 5、10、15、20、30、45、60、90、120 和 180 min 共 10 个时间点的累积溶出量数据计算 f_2 值，自制制剂与参比制剂在溶出介质中的溶出曲线见图 2，计算得两者溶出曲线的 f_2 值为 75.6，溶出行为相似。

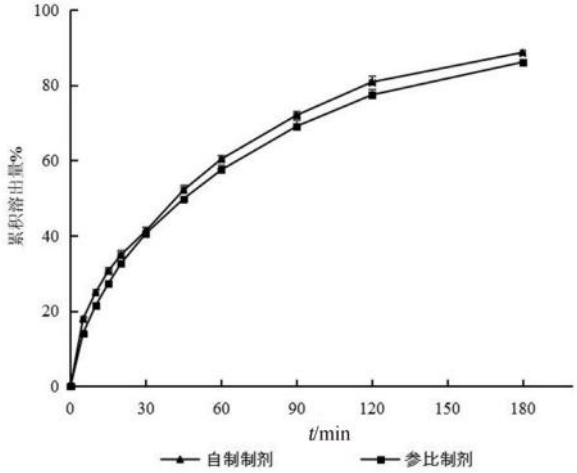


图 2 自制替比培南匹酯颗粒和参比制剂的体外溶出曲线（n = 12）

Fig 2 In vitro dissolution profile of the self-made and reference preparation granules of tebipenem pivoxil（n = 12）

2.3.2　自制颗粒的体外溶出行为　按“2.2.4”项下的优化制备工艺，连续试制 3 批各 2000 袋的样品（批号分别为 180501、180502 和 180503），3 批样品在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的体外溶出曲线见图 3，结果表明，自制制剂的工艺重现性好，质量稳定。

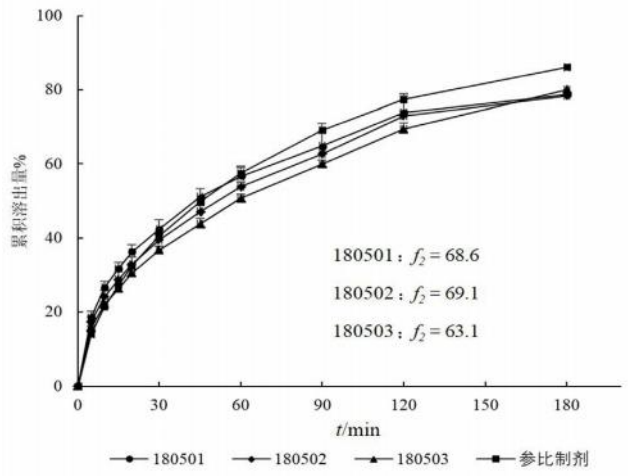


图 3　3 批自制替比培南匹酯颗粒的体外溶出曲线（n = 12）

Fig 3　In vitro dissolution profile of 3 batches of self-made granules of tebipenem pivoxil（n = 12）

2.4　Beagle 犬体内药动学研究

2.4.1　实验方案与血样采集　采用单剂量双周期交叉实验方案，将 12 只雄性 Beagle 犬随机分为甲、乙两组，给药前均禁食 12 h 以上，自由饮水。第一个给药周期时，甲组 Beagle 犬口服参比制剂 2 袋（相当于替比培南 100 mg，配成含约替比培南为 10 mg•mL^{-1}水溶液），同样乙组口服自制制剂 2 袋（相当于替比培南 100 mg），给药 4 h 后给食并自由饮水；第二个给药周期时，甲组给予自制制剂，乙组给予参比制剂。两给药周期之间间隔 7 d 洗脱期。

分别于两周期的给药前和给药后 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8 h 于犬后肢侧隐静脉取血 0.5 mL，置于肝素钠抗凝的离心管内，冰上放置。血液采集后 2 h 内置离心机中 4000 g 离心 10 min，取上层血浆－ 80 ℃冰箱保存，待测。

2.4.2　血样处理与测定方法　取 50 μL 犬血浆，加入 5 μL 内标溶液（2.0 μg • L^{-1} 对乙酰氨基酚甲醇溶液）和 45 μL 1 mol • L^{-1} 的 3-*N*- 吗啉基丙磺酸，涡旋混匀，再加入 200 μL 乙腈，涡旋 1 min，4 ℃离心 10 min。取上清液 100 μL 加同体积纯化水混匀后进样分析。

采用 LC-MS/MS 法测定犬血浆中替比培南匹酯的含量[12-13]。色谱条件：色谱柱 Hypersil GOLD（100 mm×2.1 mm，3 μm），流动相 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵溶液 - 甲醇，梯度洗脱（0 ～ 3.0 min，10% ～ 75%B；3.0 ～ 4.2 min，75%B；4.2 ～ 5.0 min，75% ～ 10%B），柱温 30 ℃，样品盘温度 10 ℃，流速 0.2 mL • min^{-1}，进样量 5 μL。质谱条件：采用电喷雾离子源（ESI），多反应监测模式，正离子检测；用于定量分析的离子对分别为替比培南 *m/z* 384.1 → 298.0，内标对乙酰氨基酚 *m/z* 152.1 → 110.1，电离电压：4000 V，鞘气：35 Arb，辅助气：6.9 kPa，尾吹气：0 kPa，离子传输毛细管温度：350 ℃，雾化温度 50 ℃。色谱图见图 4。

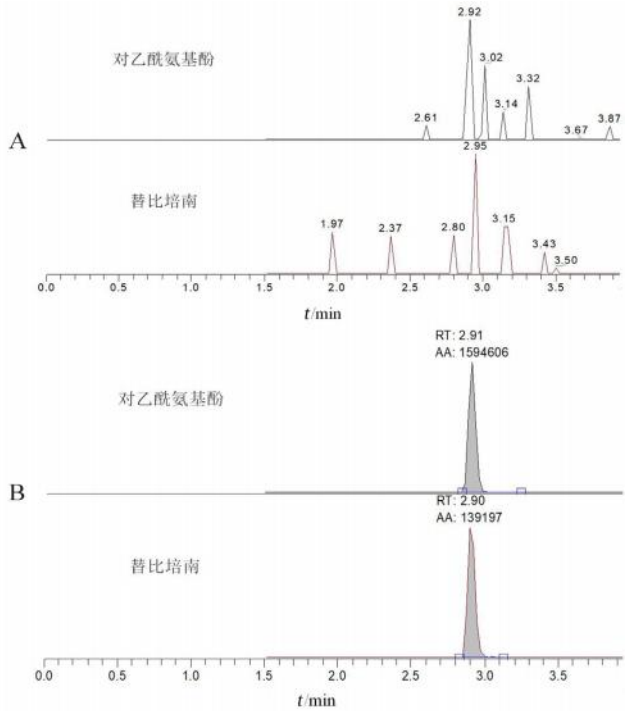


图 4　空白血浆（A）和加药空白血浆（B）图谱

Fig 4　Chromatograms of blank plasma（A）and blank plasma spiked drug（B）

2.4.3　方法考察与评价　本方法经考察：① 血浆内源性物质对待测物和内标无干扰；② 血浆内替比培南质量浓度在 20 ～ 4000 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好；③ 定量下限（20 ng • mL^{-1}）、低（50 ng•mL^{-1}）、中（1000 ng•mL^{-1}）、高（3200 ng • mL^{-1}）4 个质控浓度的批内准确度 *RSD* 分别为 10.2%、5.1%、5.0%、－ 2.1%，精密度 *RSD* 分别为 5.6%、7.1%、2.9%、3.0%；④ 内标归一化基质效应因子分别为 84.5%、90.0%、89.6%、92.5%；⑤ 低、高两浓度质控样品室温放置 4 h，－ 80 ℃冷冻 30 d，冻融 3 次稳定，与理论浓度比较，准确度分别为 2.5% 和－ 0.8%，－ 4.6% 和 3.1%，1.9% 和－ 2.0%。由此可见，本方法可用于 Beagle 犬血浆中替比培南的测定。

2.4.4　结果　Beagle 犬口服自制和参比替比培南匹酯的平均血药浓度 - 时间曲线见图 5。各时间点血药浓度数据用 DAS 2.0 软件拟合药动学参数，

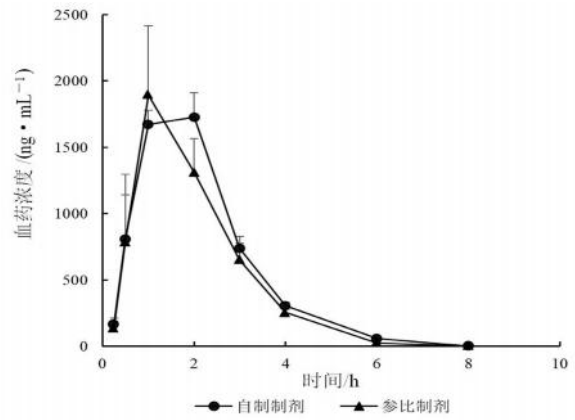


图 5 替比培南匹酯颗粒口服给药后 Beagle 犬体内的平均血药浓度 - 时间曲线（n = 12）

Fig 5 Average drug concentration-time curve in beagle dogs after the oral administration of tebipenem pivoxil granules（n = 12）

结果采用非房室模型参数数据，具体参数见表 5。由表 5 可知，在 Beagle 犬体内，自制制剂和参比制剂的 C_{max}、t_{max} 差异无统计学意义（P > 0.05）。以 $AUC_{0\sim t}$ 计算得自制制剂的相对生物利用度为（118.67±14.57）%。

表 5 替比培南匹酯颗粒自制制剂和参比制剂的主要药动学参数（n = 12）

Tab 5 Main pharmacokinetic parameters of tebipenem pivoxil granules self-made and reference preparations（n = 12）

参数	自制制剂	参比制剂
$AUC_{0\sim t}$/（h • μg • L^{-1}）	4615±609	3971±934
$AUC_{0\sim\infty}$/（h • μg • L^{-1}）	4678±652	4215±897
$MRT_{0\sim t}$/h	2.05±0.19	1.8±0.13
$MRT_{0\sim\infty}$/h	2.13±0.20	2.04±0.13
$t_{1/2z}$/h	0.881±0.184	0.909±0.211
t_{max}/h	1.5±0.55	1.17±0.41
CLz/F/（kg • L • h^{-1}）	2.17±0.32	2.46±0.497
Vz/F/（L • kg^{-1}）	2.77±0.81	3.14±0.59
C_{max}/（μg • L^{-1}）	1838±179	1915±402

3 讨论

本品为儿童用抗菌药物制剂，口感是影响该药物服药顺应性的关键因素，采用包衣掩味技术做成细颗粒剂能有效地解决该药物的口感问题。但包衣颗粒的硬度、圆整度、粒度等会对包衣效果产生影响，只有颗粒具有一定的硬度、圆整度好才能够在底喷包衣时保证衣膜的完整性和均匀性[14]。本实验采用传统的湿法制粒工艺制备内核颗粒，在颗粒成型后调整制粒参数，使得颗粒更密实、圆整，控制筛网孔径半干整粒，保证了颗粒粒度的均一性。同时选择乙基纤维素水分散体和尤特奇 NE30 作为掩味材料，能够有效地掩盖替比培南匹酯的苦味，提高服药的顺应性。羟丙基甲基纤维素 E6 作为可溶性的辅料，在掩味衣膜中作为致孔剂，对本品在 pH 6.8 缓冲液中的溶出起着调节作用，使得本品体外溶出行为与参比制剂相似。

根据参比制剂药动学资料，替比培南在人体内血药浓度 t_{max} 约 0.7 h，$t_{1/2}$ 约 1.0 h，每日需服药两次，因此本实验在给药前后采集 8 h 内的 Beagle 犬血浆，并采用 LC-MS/MS 法测定能够准确反映药物在 Beagle 犬体内的代谢情况。Beagle 犬体内的药动学的对比实验显示，自制制剂和参比制剂的血药浓度 - 时间曲线也无显著差异。可见自制替比培南匹酯颗粒的处方工艺可行，质量稳定，与参比制剂相似，为替比培南匹酯颗粒的仿制研究提供了依据。

参考文献

[1] 刘涛，臧远胜，修清玉 . 碳青霉烯类抗菌药物研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志，2013，32（12）：927-931.

[2] 胡云建，陈东科，陶凤荣，等 . 替比培南匹伏酯的体外抗菌作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2012，28（12）：950-954.

[3] 罗文燕，丁颖，秦峰 . 培南类抗菌药质量控制方法的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（1）：42-55.

[4] 张文君，吴文芳，冯小龙 . 新型口服碳青霉烯类抗菌药物 - 泰吡培南酯 [J]. 河北医药，2010，32（18）：2596-2599.

[5] ORAPENEM® FINE GRANULES 10% FOR PEDIATRIC [EB/OL]. [2022-02-08]. https：//www. pmda. go. jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/780009_6139002C1026_1_10.

[6] 徐晨，谢俊，黄春玉，等 . 粉末包衣技术在药物制剂领域的应用研究进展 [J]. 药学进展，2013，37（12）：635-641.

[7] 陈爱萍，姜东成，朱雪萍，等 . 粉末包衣技术制备替比培南酯细粒剂 [J]. 天津药学，2016，28（2）：18-20.

[8] 付晓峰，柯学 . 口服药物溶出技术与体内外相关性的研究进展 [J]. 药学与临床研究，2012，20（2）：142-147.

[9] 赵悦清，柳文洁，程泽能 . 口服固体制剂的体外溶出实验及体内外相关性研究进展 [J]. 中国药房，2018，29（12）：1718-1723.

[10] 温许，宋洪涛 . 难溶性药物口服吸收体内外相关性的研究进展 [J]. 中南药学，2012，9（3）：215-219.

[11] 肖全英，王绛玉，钟佳胜，等 . 泰比培南酯细粒剂的关键质量属性研究 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（22）：2841-2845.

[12] 罗玉莹，周艺佳，崔佳丽 . 替比培南匹酯在犬体内的相对生物利用度研究 [J]. 质量安全与检测，2021，31（2）：83-87.

[13] 师冰，张柏娥，杨晓燕，等 . 替比培南匹酯颗粒在中国健康受试者体内生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（15）：2056-2060.

[14] 孔松涛，蓝鹰，赵丽君，等 . 基于颗粒特性的流化床包衣质量影响因素综述 [J]. 中国医药工业杂志，2020，51（3）：325-333.

（收稿日期：2022-10-05；修回日期：2022-12-06）

基于 AHP- 模糊数学综合评价枇杷清肺饮矫味工艺

胡泽萍[1, 2, 3]，张福明[2, 3]，高子涵[2, 3]，宋兆辉[2, 3*]，何毅[2, 3]（1. 中国药科大学中药学院，南京　211198；2. 天士力医药集团股份有限公司研究院 现代中药开发中心，天津　300410；3. 天士力医药集团股份限公司 创新中药关键技术国家重点实验室，天津　300410）

摘要：目的　优选枇杷清肺饮最佳矫味配方。**方法**　首先建立口感评价标准，结合 AHP- 模糊数学法从甜味、香气、口腔余味、总体口感四个方面评价不同矫味剂对枇杷清肺饮的掩味效果。**结果**　处方 4 评分结果最高，矫味效果最好，即每 1.6 g 浸膏粉加入 0.15% 纽甜和 1.0% 橙粉末香精 1。**结论**　运用 AHP- 模糊数学评价相结合的方法，筛选出枇杷清肺饮的最优矫味配方，极大改善了原制剂的口感，提高了患者的顺应性，可为制剂的工业化生产提供参考。

关键词：枇杷清肺饮；矫味剂；层次分析法；模糊数学综合评价法

中图分类号：R283.6　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1815-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.020

Comprehensive evaluation of flavor correction technology of Pipa Qingfei decoction based on AHP-fuzzy mathematics

HU Ze-ping[1, 2, 3], ZHANG Fu-ming[2, 3], GAO Zi-han[2, 3], SONG Zhao-hui[2, 3*], HE Yi[2, 3] (1. *School of Traditional Chinese Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing*　211198; 2. *Development Center of Modern Chinese Medicine*, *Tasly Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd.*, *Tianjin*　300410; 3. *State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine*, *Tasly Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd.*, *Tianjin*　300410)

Abstract: Objective　To optimize the best taste correction technology of Pipa Qingfei decoction. **Methods**　The taste evaluation criteria were established concerning the masking effect of different taste correcting agents on Pipa Qingfei decoction from 4 aspects: sweetness, aroma, mouth aftertaste and overall taste with AHP-fuzzy mathematics. **Results**　The score of prescription was the highest, and the taste correction effect was the best: 0.15% neotame and 1.0% orange powder essence 1 was added for every 1.6 g extract powder. **Conclusion**　AHP-fuzzy mathematics evaluation can screen out the optimal taste correcting formula of Pipa Qingfei decoction, greatly improve the taste of the original formulation, improve patient compliance, and provide reference for the industrial production.

Key words: Pipa Qingfei decoction; taste masking agent; analytic hierarchy process; fuzzy mathenatics evaluation

经典名方枇杷清肺饮为《古代经典名方关键信息表（7 首方剂）》[1] 之一，该方由桑白皮、蜜枇杷叶、黄连、黄柏、人参、甘草六味药材组成，主治肺风酒刺，具有疗效确切，不良反应少，临床应用广泛等优点。方中主要含有生物碱（小檗碱、黄连碱、黄柏碱等）、萜类（齐墩果酸、熊果酸、人参皂苷等）、黄酮类（芦丁等）成分，是苦味药材的代表性物质，也是枇杷清肺饮产生苦味不良口感的主要原因 [2]。该药入口极苦，且苦味回味长久不能消退，导致患者顺应性下降，严重限制了该制剂的应用。

层次分析法（analytic hierarchy process，AHP）

基金项目：国家“中医药优势领域的创新中药关键技术开发研究”科技重大专项（No.2017ZX09301005）。

作者简介：胡泽萍，女，硕士研究生，主要从事中药制剂研究，email：huzepingmsn@163.com　*通信作者：宋兆辉，男，博士，高级工程师，主要从事中药新药研发与质量控制研究，email：songzh@tasly.com

是一种定量与定性相结合的多目标决策分析方法，可以将一个复杂的决策问题结构化从而更有利于判断，提高决策的有效性和可行性。构造层次结构模型一般按4个步骤进行，分别为建立递阶层次结构、构造判断矩阵、计算权重向量及一致性检验[3]。目前 AHP 广泛应用于交通[4]、农业[5]、医药[6]等多个领域。

模糊数学又称 Fuzzy 数学，是研究和处理模糊现象的一种数学理论和方法。模糊数学综合评价法（Fuzzy synthetic evaluation method）是根据模糊数学隶属理论，将定性转化为定量的一种评价方法[7]。其基本步骤为：① 确定评价对象的因素集与评语集；② 确定权重系数；③ 获得模糊综合评价矩阵；④ 运算得到综合评价结果[3]。目前，模糊数学已应用于各个行业，例如优化红枣茶的发酵工艺[8]、水蛭掩味方法的筛选[9]等。

本实验采用添加矫味剂（甜味剂、芳香剂）的掩味方法，运用 AHP-FSEM 综合评价枇杷清肺饮矫味配方，以改善原处方口感，提高患者顺应性，为该制剂的产业化研究提供理论依据。

1 材料

十万分之一电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；枇杷清肺饮浸膏粉（批号：20220601，天士力研究院多功能提取平台）；麦芽糊精（批号：2020012453，吉林中粮生化能源销售有限公司）；三氯蔗糖（批号：KB202103018，山东康宝生化科技有限公司）；纽甜（批号：21022203，山东奔月生物科技股份有限公司）；橙粉末香精 1（批号：BH1278589），橙粉末香精 2（批号：BH1285602），柠檬粉末香精 1（批号：257903），水蜜桃粉末香精（批号：257854），杂果粉末香精（批号：257792）[森馨香精色素科技（中国）有限公司]。柠檬粉末香精 2（批号：2022-2-8，上海普若味可生物科技有限公司）。

2 方法与结果

2.1 感官评价方法

2.1.1 样品溶液的制备 称取枇杷清肺饮浸膏粉与麦芽糊精（16∶9）混合后的粉末约 2.5 g，分别加入不同的矫味剂，精密称定，置于玻璃杯中，加入 100 mL 热水，搅拌溶解，稍微冷却后置于温水中保温，由志愿者进行品尝。

2.1.2 评价人员筛选[10-11] 选择 20 名身体健康的志愿者，筛选标准如下：① 年龄在 20 ～ 40 岁，通过味觉感知能力测试；② 非易过敏体质，且近期未服用药物；③ 评价前 4 h 内未饮酒、抽烟，未嚼口香糖，未进食对味蕾有强烈刺激的食物。

2.1.3 经典人群口感评价方法[12] 取样品溶液 15 mL 于口尝杯中，由志愿者含于口中，此间口腔做漱口动作约 10 s，使舌头能充分感受药物滋味，随后吐出药液，用纯净水漱口至口腔无苦味后进行下一个样品测试（采用随机、单盲方法进行实验）。

2.1.4 评价标准建立 以甜味、香味、口腔余味、总体口感为评价指标，评价结果分为优、良、中、差 4 个等级，志愿者口尝法品味样品后，给出评价结果，依据表 1 味觉评价标准在各评价指标下相应的评价等级中打√。

表 1 味觉评价标准

Tab 1 Taste evaluation criteria

等级	甜味	香味	口腔余味	总体口感
优	甜味适中，可遮掩大部分苦味	适中，协调一致	苦味无、甜 / 香味适中	优
良	甜味稍浓，可遮掩大部分苦味	偏淡，基本协调	苦味淡、甜 / 香味适中	良
中	甜味淡，可遮掩部分苦味	稍浓，不协调	苦 / 甜 / 香味稍浓	中
差	甜味无，苦味难以忍受；甜味浓，甜苦分离明显	无或浓，有其他异味	苦 / 甜 / 香味过浓	差

2.2 AHP 层次分析法

2.2.1 层次结构的建立[13] 层次结构一般分为三层，自上而下分别为目标层、准则层与方案层，上层受下层影响。根据枇杷清肺饮加入矫味剂后的特点，从影响口感的因素中筛选出甜味、香气、口腔余味、总体口感 4 个评价指标作为准则层，以口感综合评价作为目标层，不同矫味配比的处方为方案层，从而构建多层次结构分析模型。

2.2.2 构造判断矩阵[14] 以 1 ～ 9 标度法为依据，判断同一层次指标间的相对重要程度，构建判断矩阵 A，见表 2，确定指标的权重系数。

将判断矩阵 A 的各行向量进行几何平均，按照公式（1）计算得到初始权重系数 W_i，然后按照公式（2）计算归一化权重系数 W_j，最终得到 4 个指标的权重系数，分别为甜味 0.30、香气 0.08、口腔余味 0.24、总体口感 0.38。

$$W_i = \sqrt[n]{a_1 a_2 a_3 \cdots a_n} \quad (1)$$

$$W_j = W_i / \sum_{j=1}^{n} W_i \quad (2)$$

2.2.3 一致性检验[13, 15-16] 判断矩阵是由决策者主观意识构建，可能存在各指标重要程度出现矛盾

表 2　指标成对比较的判断优先矩阵

Tab 2　Decision matrix of paired comparison on indexes

评价指标	甜味	香气	口腔余味	总体口感
甜味	1	4	1	1
香气	1/4	1	1/3	1/5
口腔余味	1	3	1	1/2
总体口感	1	5	2	1

的情况，为了验证权重系数的合理性，对判断矩阵进行一致性检验必不可少。其中一致性比率 *CR* 是衡量权重系数合理性的重要依据，*RI* 为随机一致性指标。当 *CR* ＜ 0.1 时（*CR* ＝ *CI*/*RI*），即认为判断矩阵具有满意一致性。首先按照公式（3）计算最大特征根 λ_{max}，之后根据公式（4）计算一致性指标 *CI*，*CI* ＝ 0.0136，最后得到 *CR* 值为 0.015，小于 0.1，表明该矩阵具有一致性。

$$\lambda_{max} = 1/n \sum_{j=1}^{n} (AW)_j/W_j \quad (3)$$

$$CI = (\lambda_{max} - n)/(n - 1) \quad (4)$$

W 为矩阵 A 的特征向量，W_j 为权重系数。

2.3　模糊数学评价法

2.3.1　因素集与评语集的确定 [17]　因素集即影响枇杷清肺饮感官质量的指标合集，选择 4 个评价指标建立评价因素集：*U* ＝ [甜味 香气 口腔余味 总体口感] ＝ [U_1 U_2 U_3 U_4]。

评语集是指枇杷清肺饮感官评价等级的合集，分为优、良、中、差 4 个等级，采用百分制对矫味配方打分，设定优 100 分，良 80 分，中 60 分，差 40 分，即评语集 *V* ＝ [优 良 中 差] ＝ [V_1（100）V_2（80）V_3（60）V_4（40）]。

2.3.2　评价结果统计　20 名志愿者依据表 1 味觉评价标准，对初步筛选后口感较好的处方（样品 1 ～ 8）进行口尝评价，确定两种矫味剂的种类后对其用量进行筛选（样品 9 ～ 12）(见表 3)，感官评价结果见表 4。

表 3　枇杷清肺饮混合粉末加入不同矫味剂的配方设计

Tab 3　Formulation design of adding different kinds of corrigents to Pipa Qingfei decoction mixed powder

No.	浸膏粉＋麦芽糊精 /g	矫味剂 1	用量 /%	矫味剂 2	用量 /%
1	1.6 ＋ 0.9	三氯蔗糖	1.5	橙粉末香精 1	1.0
2	1.6 ＋ 0.9	三氯蔗糖	1.5	橙粉末香精 2	1.0
3	1.6 ＋ 0.9	三氯蔗糖	1.5	柠檬粉末香精 1	1.0
4	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.15	橙粉末香精 1	1.0
5	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.15	水蜜桃粉末香精	1.0
6	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.15	杂果粉末香精	1.0
7	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.15	柠檬粉末香精 2	1.0
8	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.15	薄荷粉末香精	1.0
9	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.15	橙粉末香精 1	0.5
10	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.15	橙粉末香精 1	1.5
11	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.20	橙粉末香精 1	0.5
12	1.6 ＋ 0.9	纽甜	0.20	橙粉末香精 1	1.0

注：矫味剂加入量以枇杷清肺饮（干粉）的百分比加入。

Note：The amount of flavor correction was added as a percentage of Pipa Qingfei decoction（dry powder）.

表 4　枇杷清肺饮矫味配方感官评价结果

Tab 4　Sensory evaluation of taste-modifying formula of Pipa Qingfei decoction

No.	甜味				香气				口腔余味				总体口感			
	优	良	中	差	优	良	中	差	优	良	中	差	优	良	中	差
1	1	4	14	1	2	10	4	4	0	2	16	2	1	4	14	1
2	5	5	9	1	3	10	4	3	0	7	10	3	2	10	7	1
3	6	5	8	1	6	5	5	4	2	8	7	3	3	8	9	0
4	4	10	5	1	4	9	6	1	3	9	7	1	4	8	6	2
5	4	9	7	0	6	5	6	3	5	4	8	3	4	7	8	1
6	5	6	9	0	3	7	8	2	5	4	7	4	4	5	9	2
7	1	7	9	3	2	7	9	2	0	5	10	5	0	4	13	3
8	5	5	6	4	3	7	8	2	2	6	6	6	3	6	5	6
9	4	4	9	3	5	3	9	3	1	7	7	5	3	7	6	4
10	6	5	6	3	3	9	5	3	3	6	7	4	4	8	4	4
11	5	7	3	5	6	4	7	3	4	5	6	5	4	4	8	4
12	4	10	5	1	4	5	7	4	2	5	10	3	6	4	8	2
权重	0.30				0.08				0.24				0.38			

2.3.3　建立模糊矩阵 [16，18-19]　将表 4 中各样品的评价因素各等级所得票数折算成赞成比率，联合各样品所有因素的评价结果，得到各样品的模糊矩阵 R。例如 1 号样品模糊矩阵：

$$R_1=\begin{bmatrix} 1/20 & 4/20 & 14/20 & 1/20 \\ 2/20 & 10/20 & 4/20 & 4/20 \\ 0/20 & 2/20 & 16/20 & 2/20 \\ 1/20 & 4/20 & 14/20 & 1/20 \end{bmatrix}=\begin{bmatrix} 0.05 & 0.20 & 0.70 & 0.05 \\ 0.10 & 0.50 & 0.20 & 0.20 \\ 0.00 & 0.10 & 0.80 & 0.10 \\ 0.05 & 0.20 & 0.70 & 0.05 \end{bmatrix}$$

2.3.4　确定隶属度集　已知枇杷清肺饮感官评

价各指标权重向量为：H =（0.30，0.08，0.24，0.38），根据模糊变换原理，$Y = H \times R$，按乘法 - 有界算法 $M(\cdot, \oplus)$进行计算。于是样品 1 的综合评价结果为：$Y_1 = HR_1$ =（0.30，0.08，0.24，0.38）$\times \begin{bmatrix} 0.05 & 0.20 & 0.70 & 0.05 \\ 0.10 & 0.50 & 0.20 & 0.20 \\ 0.00 & 0.10 & 0.80 & 0.10 \\ 0.05 & 0.20 & 0.70 & 0.05 \end{bmatrix}$；

$Y_{1\text{-}1} = 0.30 \times 0.05 + 0.08 \times 0.10 + 0.24 \times 0.00 + 0.38 \times 0.05 = 0.042$；

$Y_{1\text{-}2} = 0.30 \times 0.20 + 0.08 \times 0.50 + 0.24 \times 0.10 + 0.38 \times 0.20 = 0.199$；

$Y_{1\text{-}3} = 0.30 \times 0.70 + 0.08 \times 0.20 + 0.24 \times 0.80 + 0.38 \times 0.70 = 0.686$；

$Y_{1\text{-}4} = 0.30 \times 0.05 + 0.08 \times 0.20 + 0.24 \times 0.10 + 0.38 \times 0.05 = 0.073$；

即 Y_1 =（0.042，0.199，0.686，0.073）；同理可得：Y_2 =（0.126，0.388，0.405，0.081）；Y_3 =（0.195，0.343，0.396，0.066）；Y_4 =（0.188，0.450，0.293，0.069）；Y_5 =（0.220，0.337，0.377，0.066）；Y_6 =（0.223，0.261，0.422，0.093）；Y_7 =（0.038，0.261，0.527，0.174）；Y_8 =（0.168，0.289，0.289，0.254）；Y_9 =（0.149，0.289，0.369，0.193）；Y_{10} =（0.215，0.334，0.270，0.181）；Y_{11} =（0.223，0.258，0.296，0.223）；Y_{12} =（0.214，0.307，0.374，0.104）。

2.3.5 综合评分 已知评语集 4 个等级对应的分值，将综合评价结果与相应的分数相乘，并进行加和，最终得到各个产品的综合评分 $Z_i = Y_i \times V$。以样品 1 为例：Z_1 = 0.042×100 + 0.199×80 + 0.686×60 + 0.073×40 = 64.19；同理可得 Z_2 = 71.16；Z_3 = 73.34；Z_4 = 75.14；Z_5 = 74.20；Z_6 = 72.28；Z_7 = 63.27；Z_8 = 67.42；Z_9 = 67.88；Z_{10} = 71.65；Z_{11} = 69.60；Z_{12} = 72.62；由结果可知，处方 4 评分最高，评分为 75.14；当纽甜加入量为 0.15% 时，可遮掩大部分苦味，但其苦味回味久；加入适量芳香剂不仅能改善口腔余味，还可提升综合口感，因此选择处方 4（0.15% 纽甜＋ 1.0% 橙粉末香精 1）为最优处方。

2.4 验证试验

按照处方 4 的矫味配比制备 3 批样品进行验证试验，依据 “2.3” 项下模糊数学评价法进行感官评价，结果见表 5。X_1 =（0.230，0.388，0.320，0.061）= 75.75；X_2 =（0.211，0.419，0.290，0.080）= 75.24；X_3 =（0.249，0.366，0.300，0.085）= 75.60，且 3 批样品评分结果的相对标准偏差为 0.35%，表明该处方重现性良好，可作为枇杷清肺饮最优的矫味配方，为该产品后续的开发提供参考。

表 5 枇杷清肺饮感官评价验证结果

Tab 5 Verification of sensory evaluation of Pipa Qingfei decoction

No.	甜味				香气				口腔余味				总体口感			
	优	良	中	差	优	良	中	差	优	良	中	差	优	良	中	差
X_1	5	9	6	0	3	9	5	3	4	7	8	1	5	7	6	2
X_2	5	9	5	1	3	9	6	2	4	8	8	0	4	8	5	3
X_3	6	7	6	1	4	8	6	2	4	8	6	2	5	7	6	2

3 讨论与总结

在确定不同矫味配比处方前，本课题组对矫味剂进行了单因素筛选，发现以下问题：① 纽甜和三氯蔗糖用量在一定范围内，可遮盖大部分苦味，但随着用量增加，甜腻感强烈，并且甜苦分离明显，口感变差；② 单用甜味剂进行矫味时，发现三氯蔗糖比纽甜抑苦效果好，但增加用量均不能改善余苦强烈持久的问题，芳香剂的加入不仅能改善口腔余味，还可以增加甜味，效果显著。因此，选用掩味剂联用方法，来改善枇杷清肺饮口感。

经研究表明，添加甜味剂可以混淆大脑味觉中枢，降低人体对苦味的感受程度，达到掩盖苦味的目的 [20]。纽甜属于人工甜味剂，其甜味是蔗糖的 7000 ～ 13 000 倍，不参与机体代谢，甜度高，能量低，适用于包括儿童、孕妇和糖尿病患者等，并通过美国 FDA 批准，安全性高 [21]。张璐等 [22] 评价纽甜对苦味中药的掩味效果，发现加入 0.4% 浓度的纽甜时，可以不同程度遮盖黄柏和黄连药材的苦味，分别为 71.88%、49.12%，结果表明纽甜对黄连、黄柏两味中药有明显的掩味效果。添加芳香剂可以干扰人体嗅觉从而改善药物不良口感，与甜味剂联用可以起到协同增效的作用 [23]。祝洪艳等 [24] 采用模糊数学评价复方板蓝根口服液矫味配方，发现三氯蔗糖与桔子香精联用能明显改善复方板蓝根口服液口感。

本研究首先运用层次分析法确定各指标权重系数，将定性分析转化为定量分析，降低了决策者赋权时的主观性，提高决策的合理性；再结合模糊数学评价方法对各矫味配方的掩味效果进行评价，通过综合评分筛选出处方 4 为最优配比，该方案可有

效遮盖枇杷清肺饮的苦味口感，数据可信度高；综上所述，两种方法结合运用，使评价结果更客观准确，可为枇杷清肺饮的矫味配方提供理论依据。

参考文献

[1] 国家药品监督管理局，国家中医药管理局 . 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表（7 首方剂）》的通知 [EB/OL]. [2022/9/21]. https：//www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwj-yp/20201111091109170.html.

[2] 杨挡，姜梦华，封亮，等 . 基于中药口服液体制剂不良口感综合分析的蒲地蓝消炎口服液顺应性改善研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（18）：4316-4323.

[3] 江高 . 模糊层次综合评价法及其应用 [D]. 天津：天津大学，2005.

[4] 李庆旭，刘光琇，邵麟惠 . 层析分析法在高速公路生态环境影响评价中的应用 [J]. 冰川冻土，2007，29（4）：653-658.

[5] 何肖肖，王娇娇，孙鲁龙，等 . 基于 AHP-EWM 评价陕西渭北地区无袋栽培苹果果实品质 [J]. 甘肃农业大学学报，2022，57（6）：70-78，87.

[6] 王梦珂，王梦伟，李蒙恩，等 . 基于 AHP- 熵权法的白附子有效成分与颜色值的相关性研究 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（12）：125-131，296.

[7] 康倩，张庆，李辉，等 . 模糊数学在复方双花口服液矫味工艺中的应用 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2015，17（1）：192-196.

[8] 谢小瑜，冯俊毓，覃丽芳 . 模糊数学感官评价法优化红枣茶发酵饮料工艺 [J]. 粮食与油脂，2021，34（2）：84-88.

[9] 杨梅，李蔚群，张微，等 . 基于模糊数学综合评价的水蛭掩味方法 [J]. 中国现代中药，2021，23（4）：685-690.

[10] 吴飞，王优杰，张继全，等 . 康儿灵颗粒的矫味研究 [J]. 中国新药杂志，2014，23（6）：701-705.

[11] 赵玥瑛，王昌海，张泽康，等 . 口服制剂口感评价方法的应用进展 [J]. 中国中药杂志，2022，47（2）：358-366.

[12] 饶智，陈光宇，何群，等 . 基于电子舌技术与人工口尝评价相结合的羌活胜湿汤矫味技术研究 [J]. 中药材，2021，44（3）：658-663.

[13] 陆玉婷，伍善广，陈婕，等 . AHP- 模糊数学综合评价法优化罗汉果奶茶配方 [J]. 中国乳品工业，2018，46（1）：61-64.

[14] 代珊，李帅，张爱军，等 . 基于基准关联度和 AHP- 熵权法综合评价经典名方小续命汤古今提取工艺 [J]. 中草药，2022，53（3）：726-734.

[15] 曹茂林 . 层次分析法确定评价指标权重及 Excel 计算 [J]. 江苏科技信息，2012，383（2）：39-40.

[16] 孙福东，魏凤荣 . 应用 Excel 巧解模糊综合评价法 [J]. 统计与决策，2011，347（23）：172-174.

[17] 王振东，马静雯，刘世娟，等 . 模糊数学感官评价法优化健脾养胃复合营养冲调粉配方工艺 [J]. 食品与发酵科技，2022，58（4）：93-98.

[18] 康冰亚，刘瑞新，孟祥乐，等 . 基于 ISEM 及 FSEM 综合评价中药伴侣的掩味效果 [J]. 中国新药杂志，2016，25（12）：1385-1390.

[19] 李龙龙，李哲，屈云萍，等 . 基于模糊数学的益气通络颗粒处方评价 [J]. 现代中药研究与实践，2016，30（5）：36-39.

[20] 吴陈晖，杨艳君，朱毛毛，等 . 创新儿童中药制剂的造粒掩味关键技术研究概况 [J]. 中国中药杂志，2022，47（21）：5708-5716.

[21] 姜彬，冯志彪 . 甜味剂发展概况 [J]. 食品科技，2006（1）：71-74.

[22] 张璐，施钧瀚，康冰亚，等 . 纽甜对 5 种苦味中药的掩味效果 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2014，16（9）：1904-1907.

[23] 刘斌斌，简晖，田佳明，等 . 中药矫味与掩味技术的研究进展及问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（16）：229-234.

[24] 祝洪艳，张秋梅，王国丽，等 . 复方板蓝根口服液矫味的模糊数学综合评价 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（7）：8-10.

（收稿日期：2022-10-17；修回日期：2022-11-30）

基于网络药理学和指纹图谱的远志抗抑郁质量标志物的预测

杨素德[1, 2]，吴信华[1, 2]，高洪邺[1, 2]，黄广伟[1, 2*]，孙仁弟[1, 2]（1. 上海绿谷生命园医药有限公司，上海 201707；2. 上海复方中药（绿谷）工程技术研究中心，上海 201707）

摘要：目的 预测远志药材抗抑郁的质量标志物（Q-marker），并建立其质量评价方法。**方法** 利用网络药理学和分子对接，预测远志抗抑郁的核心成分。结合指纹图谱、化学模式识别方法对远志药材进行定性研究，寻找不同产地远志药材的共性成分，进一步确定远志药材中潜在的 Q-marker。**结果** 通过网络药理学分析，预测细叶远志皂苷、3，6'- 二芥子酰基蔗糖、瓜子金皂苷ⅩⅩⅠ、远志呫酮Ⅲ、西伯利亚远志糖 A5 和西伯利亚远志糖 A6 等 12 个成分为远志抗抑郁的核心成分，通过作用于 IL2、VEGFA、APP、HSP90AA1、PLCG1 等关键靶点，从而调控信号通路，发挥抗抑郁作用。分子对接验证显示关键靶点与核心成分具有较好的结合活性。同时建立 20 批远志药材的指纹图谱，发现 29 个共有峰，相似度在 0.95 以上。综合网络药理学活性和成分的可测性以及 Q-marker 理念，最终确定 3，6'- 二芥子酰基蔗糖、远志呫酮Ⅲ、西伯利亚远志糖 A5 和西伯利亚远志糖 A6 为远志药材的 Q-marker。**结论** 本研究利用网络药理学进行初步预测，同时建立指纹图谱结合化学模式识别分析加以确定，为远志药材 Q-marker 的研究提供参考。

关键词：远志；质量标志物；网络药理学；指纹图谱；质量评价
中图分类号：R286，R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1820-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.021

Predictive of *Polygala Tenuifolia* quality markers for antidepressant effect based on network pharmacology and fingerprints

YANG Su-de[1, 2], WU Xin-hua[1, 2], GAO Hong-ye[1, 2], HUANG Guang-wei[1, 2*], SUN Ren-di[1, 2] (1. *Shanghai Green Valley Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai* 201707; 2. *Shanghai Compound Traditional Chinese Medicine* (*Green Valley*) *Engineering Technology Research Center, Shanghai* 201707)

Abstract: Objective To predict the antidepressant quality-markers (Q-markers) of *Polygala Tenuifolia*, and establish corresponding quality evaluation method. **Methods** Network pharmacology and molecular docking were used to predict the core components of *Polygala Tenuifolia* with antidepressant effect. Fingerprints and chemical pattern recognition methods were used to conduct qualitative research on *Polygala Tenuifolia*, and to find the commonality of ingredients in *Polygala Tenuifolia* from different origins to further identify the potential Q-markers in Polygala. **Results** Through network pharmacology analysis, totally 12 core ingredients, such as tenuifolin, 3, 6'-disinapoylsucrose, polygalasaponin ⅩⅩⅠ, polygalaxanthone Ⅲ, sibiricose A5 and sibiricose A6 were predicted. The core components regulated signaling pathways and exerted antidepressant effects by acting on the key targets such as IL2, VEGFA, APP, HSP90AA1, and PLCG1. The molecular docking revealed that the core components and targets showed good binding interactions. The fingerprints of 20 batches of *Polygala Tenuifolia* were established, and 29 common peaks were detected with the similarity above 0.95. Based on the network pharmacology, components and the concept of Q-markers, that 3, 6'-disinapoylsucrose, polygalaxanthone Ⅲ, sibiricose A5 and sibiricose

基金项目：上海市科学技术委员会科研计划项目（No.18401930400）。
作者简介：杨素德，男，硕士研究生，主要从事新药开发与研究，email：yangsude@126.com *通信作者：黄广伟，男，高级工程师，主要从事新药开发与研究，email：hgw77@163.com

A6 were preliminarily predicted to be the Q-markers of *Polygala Tenuifolia*. **Conclusion** Network pharmacology helps make preliminary predictions, and establish fingerprints combined with chemical pattern recognition to determine the Q-markers of *Polygala Tenuifolia.*

Key words: *Polygala Tenuifolia*; Q-marker; network pharmacology; fingerprint; quality evaluation

抑郁症是由各种原因引起，以心情低落为主要症状的一种疾病，表现为兴趣丧失、自罪感、食欲下降、注意困难和自杀观念，其患病率高，复发率高，致残率高 [1-2]。

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的干燥根，味苦、辛，温，归心、肾、肺经，具有安神益智、交通心肾、祛痰、消肿等功效 [3]。远志资源分布分散，主要分布在山西、河南、陕西等丘陵地，内蒙古、辽宁、山东等地也有少量分布，其化学成分多样，包括皂苷类、寡糖酯类、呫酮类、生物碱类等。大量研究表明，远志的抗抑郁作用显著，远志中的皂苷、寡糖酯类成分及其组方可通过影响单胺类神经递质再摄取过程、调节内分泌、细胞保护、增加脑源性神经营养因子表达等多种途径发挥抗抑郁作用。其中，远志提取物可以通过改善肠道菌群结构、恢复肠屏障功能、降低肠源性内毒素释放、减轻机体炎症水平，发挥抗抑郁作用 [4]。3，6'- 二芥子酰基蔗糖抗抑郁活性与增强 5- 羟色胺（5-HT）和去甲肾上腺素能神经功能有关 [5]。细叶远志皂苷可通过增加小鼠脑皮质内 5-HT 表达、降低吲哚胺 2，3- 双加氧酶（IDO）表达、提高胆碱乙酰转移酶（ChAT）活性，达到对抑郁小鼠精神行为的改善作用 [6]。

刘昌孝院士于 2016 年提出中药质量标志物（Q-marker）的概念，Q-marker 是基于有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍五要素产生的，与中药的功能属性密切相关，且能够反映中药的安全性和有效性 [7]。在 Q-marker 确定过程中，发现能体现药材共性特征的成分尤为重要。指纹图谱是目前较成熟的用于发现不同批次产品共有成分的方法，在确定的几十种甚至上百种共有成分中，可通过计算每种成分的变量重要性投影值（variable importance in the projection，VIP）来评价成分对于共性的体现度。

网络药理学是融合系统生物学、生物信息学、网络科学等学科，从系统层次和生物网络的整体角度出发，解析药物与机体之间的分子关联，是目前中药复方多靶点机制分析与中药药效物质基础分析的重要手段之一。本研究基于 Q-marker 理论，运用网络药理学对远志的 Q-marker 进行预测，构建其指纹图谱，采用相似度分析、聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法 - 判别分析等化学模式识别方法进行评价，以期为远志药材的质量控制及作用机制研究提供参考。

1　材料

1.1　仪器

1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；MCA-D 型万分之一电子天平（德国赛多利斯公司）；C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，美国安捷伦公司）；SK250H 超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）。

1.2　试药

远志（批号：190101 ～ 190105，编号：S1 ～ S5，内蒙古赤峰；批号：190501 ～ 190505，编号：S6 ～ S10，山西运城；批号：190106 ～ 1901010，编号：S11 ～ S15，陕西商洛；批号：181201 ～ 181205，编号：S16 ～ S20，河北安国）；远志呫酮Ⅲ（纯度：95.3%，批号：111850-201705）、3，6'- 二芥子酰基蔗糖（纯度：96.6%，批号：111848-201805）（中国食品药品检定研究院）；西伯利亚远志糖 A5（纯度≥ 98.0%，批号：5564）、西伯利亚远志糖 A6（纯度≥ 95.0%，批号：5565）（诗丹德）；甲醇、乙腈（色谱纯），水（超纯水），其余试剂均为分析纯。远志药材经上海绿谷生命园张媛媛经理鉴定为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd 的干燥根。

2　方法与结果

2.1　网络药理学研究

2.1.1　潜在的 Q-marker 预测　应用 TCMID 数据库与相关文献，收集远志活性成分，再检索活性成分的预测靶点和抑郁相关的疾病靶点，两者取交集，上传至 STRING 数据库，筛选 Score ＞ 0.9 的靶点导入 Cytoscape 3.2.1 构建 PPI 网络，获得 20 个潜在核心靶点，分别为 PIK3R1、VEGFA、HSP90AA1、PIK3CA、EP300、NR3C1、ESR1、PLCG1 等。利用 David 6.8 数据库对 20 个核心靶点进行 KEGG 通路富集分析，运用 Cytoscape 软件构建“活性成分 - 核心靶点 - 通路”网络图（见

图 1），得到 12 个远志抗抑郁的潜在 Q-marker（包括细叶远志皂苷、3，6'- 二芥子酰基蔗糖、瓜子金皂苷ⅩⅩⅠ、瓜子金皂苷ⅩⅩⅧ、西伯利亚远志呫酮 A、西伯利亚远志呫吨酮 B、西伯利亚远志糖 A1、西伯利亚远志糖 A3、西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3，4，5- 三甲氧基肉桂酸、远志呫酮Ⅲ）以及 5 个可能的远志抗抑郁的关键靶点（IL2、VEGFA、HSP90AA1、APP、PLCG1）。

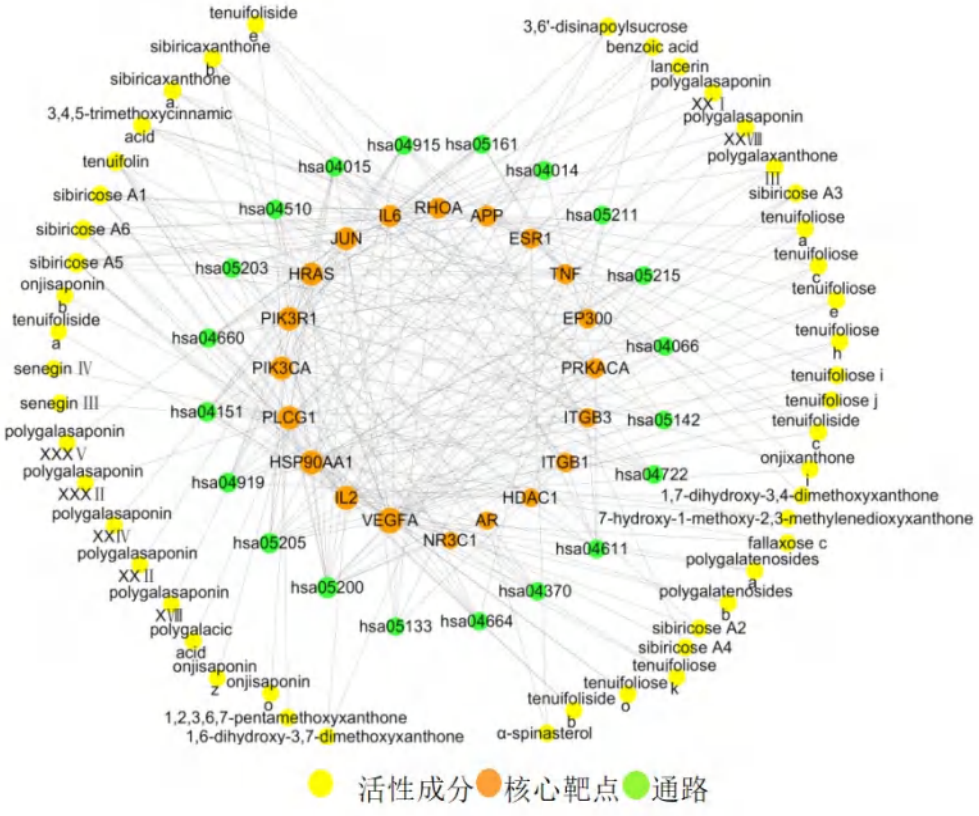


图 1　远志抗抑郁“活性成分 - 核心靶点 - 通路”网络图

Fig 1　Network diagram of active compound-core target-pathway for the antidepressant effect of *Polygala Tenuifolia*

2.1.2　分子对接验证核心成分与关键靶点　根据“活性成分 - 核心靶点 - 通路”网络筛选出的 12 个核心成分与关键靶点 IL2、VEGFA、HSP90AA1、APP、PLCG1 进行两两对接。首先，从 TCMSP 2.3 数据库下载核心成分的结构并以 mol2 格式保存。然后从 RCSB（PDB）数据库下载关键靶点的配体结构，使用 Autodock 对接每个成分和配体。结合能＜－ 5 kcal • mol^{-1} 的对接分数表明该化合物与靶点之间具有良好的结合活性，结合能越低，说明结合活性越好。对接结果见表 1，大部分成分与靶点具有较好的结合活性，提示网络药理学预测的结果具有较高的可靠性。将与 5 个靶标结合较好的对接结果利用 PyMol 可视化，如图 2 所示。

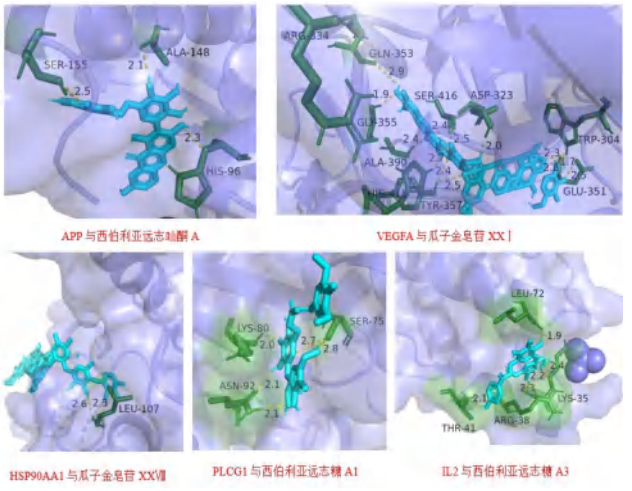


图 2　远志抗抑郁分子对接结果可视化

Fig 2　Visualization of molecular docking for the antidepressant effect of *Polygala Tenuifolia*

2.2　远志指纹图谱定性分析

2.2.1　色谱条件　色谱柱：Agilent SB C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.05% 磷酸溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 6 min，18%A；6 ～ 15 min，18% ～ 25%A；15 ～ 30 min，25% ～ 31%A；30 ～ 32 min，31% ～ 42%A；32 ～ 35 min，42% ～ 37%A；35 ～ 50 min，37% ～ 45%A）；柱温：30 ℃；流速：1 mL • min^{-1}；

表 1　远志核心成分与关键靶点对接结果

Tab 1　Docking of core components and key tagets

核心成分	成分 CID	结合能 /（kcal・mol^{-1}）				
		IL2	VEGFA	HSP90AA1	APP	PLCG1
细叶远志皂苷	21588226	－ 4.29	－ 7.04	－ 7.47	－ 5.63	－ 1.69
3，6'- 二芥子酰基蔗糖	11968389	－ 5.57	－ 6.60	－ 7.60	－ 7.37	－ 6.03
瓜子金皂苷ⅩⅩⅠ	10606178	－ 11.85	－ 20.37	－ 19.24	－ 15.01	－ 12.62
瓜子金皂苷ⅩⅩⅧ	197711	－ 11.99	－ 19.04	－ 20.31	－ 15.48	－ 14.30
西伯利亚远志呫酮 A	21581292	－ 10.70	－ 15.61	－ 15.34	－ 14.57	－ 8.63
西伯利亚远志咕吨酮 B	21581293	－ 9.15	－ 14.97	－ 15.24	－ 12.92	－ 7.86
西伯利亚远志糖 A1	6326016	－ 5.97	－ 9.22	－ 14.29	－ 9.30	－ 9.33
西伯利亚远志糖 A3	10813903	－ 10.02	－ 12.63	－ 17.41	－ 13.83	－ 7.49
3，4，5- 三甲氧基肉桂酸	735755	－ 3.44	－ 5.82	－ 3.17	－ 6.79	－ 3.17
远志呫酮Ⅲ	11169063	－ 9.28	－ 14.04	－ 13.64	－ 13.83	－ 8.56
西伯利亚远志糖 A5	6326020	－ 4.94	－ 6.17	－ 10.86	－ 10.32	－ 3.38
西伯利亚远志糖 A6	6326021	－ 5.04	－ 6.11	－ 9.05	－ 10.25	－ 4.04

检测波长：330 nm；进样量：10 μL。

2.2.2　对照品溶液的制备　精密称取远志呫酮Ⅲ、3，6'- 二芥子酰基蔗糖、西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6 对照品适量，加 70% 甲醇溶解，得到质量浓度分别为 40、150、465、332.4 μg・mL^{-1} 的对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液的制备　取远志药材粉末 1 g，精密称定，加 25 mL 70% 甲醇溶解，超声 30 min，放至室温，称定重量，补足失重，滤过，取滤液，即得。

2.2.4　方法学考察

① 参照峰的选择：3，6'- 二芥子酰基蔗糖是评价远志质量的指标性成分之一[3]，其保留时间适中，峰面积较大，峰形对称，分离度较好，故选择 3，6'- 二芥子酰基蔗糖作为参照峰（S），计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。

② 精密度试验：取远志药材（S6）粉末，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次。以 3，6'- 二芥子酰基蔗糖为参照，结果各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 *RSD* 值均小于 3%，表明该仪器精密度良好。

③ 稳定性试验：取远志药材（S6）粉末，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、1、2、4、8、12 和 24 h 分别测定。以 3，6'- 二芥子酰基蔗糖为参照，结果各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 *RSD* 值均小于 3%，表明远志供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

④ 重复性试验：取远志药材（S6）粉末 6 份，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，依法测定，以 3，6'- 二芥子酰基蔗糖为参照，结果各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 *RSD* 值均小于 3%，表明该方法的重复性良好。

2.2.5　指纹图谱的建立及相似度评价　分别取山西、陕西、内蒙古和河北各 5 批远志药材，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（版本 2012，130723），以 S1 样品色谱图为参照图谱，采用平均数法，进行多点校正和色谱峰匹配，并进行相似度计算，结果见表 2。

表 2　远志指纹图谱相似度及指标性成分定量结果

Tab 2　Quantitation of fingerprint similarity and index components of *Polygala Tenuifolia*

产地	编号	相似度	产地	编号	相似度	产地	编号	相似度	产地	编号	相似度
内蒙古赤峰	S1	0.985	山西运城	S6	0.989	陕西商洛	S11	0.991	河北安国	S16	0.986
	S2	0.986		S7	0.988		S12	0.990		S17	0.988
	S3	0.987		S8	0.987		S13	0.990		S18	0.988
	S4	0.981		S9	0.987		S14	0.991		S19	0.986
	S5	0.981		S10	0.991		S15	0.992		S20	0.982

相似度结果表明，20 批远志药材指纹图谱的相似度均大于 0.98，将其进行叠加，结果见图 3；此外，20 批远志指纹图谱共检测出 29 个共有峰，通过与对照品比对，指认出其中 4 个色谱峰，分别为西伯利亚远志糖 A5（1 号峰）、西伯利亚远志糖 A6（2 号峰）、远志呫酮Ⅲ（4 号峰）、3，6'- 二芥子酰基蔗糖（9 号峰），共有模式图见图 4。

2.2.6　主成分分析　将远志指纹图谱共有峰的峰

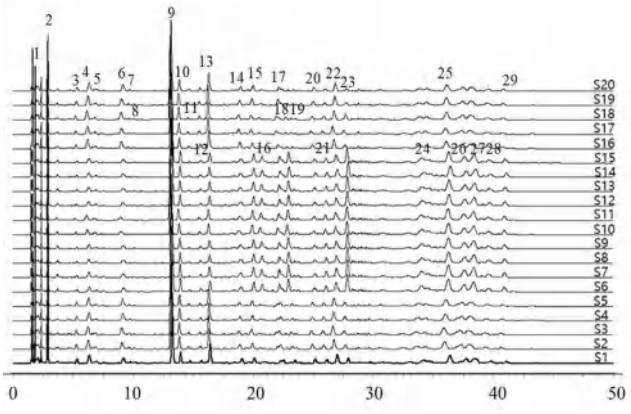


图 3 20 批远志药材的叠加 HPLC 指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprints of 20 batches of *Polygala Tenuifolia*

1. 西伯利亚远志糖 A5（sibiricose A5）；2. 西伯利亚远志糖 A6（sibiricose A6）；4. 远志叫酮Ⅲ（polygalaxanthone Ⅲ）；9（S）. 3，6'-二芥子酰基蔗糖（3，6'-disinapoyl sucrose）

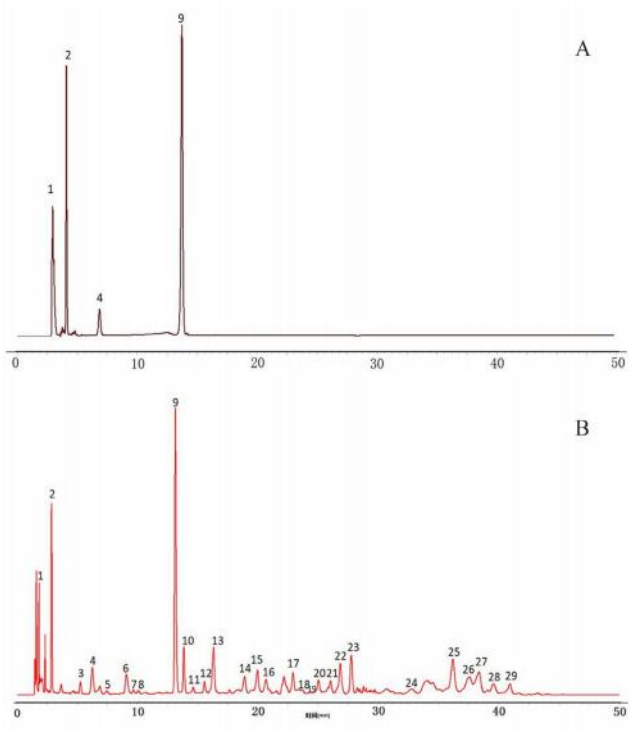


图 4 远志混合对照色谱图（A）及指纹图谱共有模式图（B）

Fig 4 Chromatogram of mixed reference substances（A）and fingerprint mutual pattern（B）

1. 西伯利亚远志糖 A5（sibiricose A5）；2. 西伯利亚远志糖 A6（sibiricose A6）；4. 远志叫酮Ⅲ（polygalaxanthone Ⅲ）；9（S）. 3，6'-二芥子酰基蔗糖（3，6'-disinapoyl sucrose）

面积数据导入 SIMCA-P14.1 软件，以 29 个共有峰作为变量，进行 PCA 分析，PCA 得分图见图 5，不同产地远志药材间存在差异，可分为两组，其中山西运城、陕西商洛较为接近，内蒙古赤峰、河北安国较为接近。

2.2.7 正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）

在 PCA 的基础上选择有监督模式的 OPLS-DA

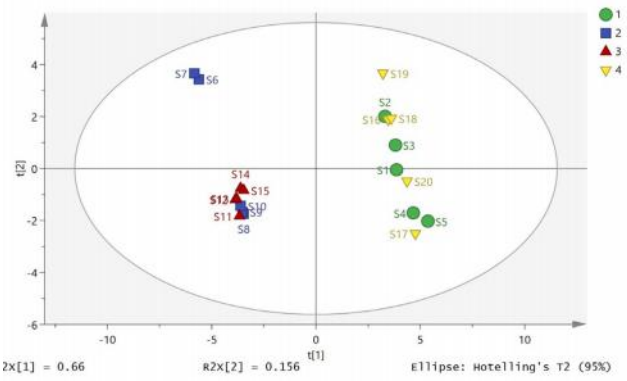


图 5 远志指纹图谱共有峰的 PCA-score 图

Fig 5 PCA-score of common peaks in *Polygala Tenuifolia* fingerprints

进行组间判别分析。将 20 批样品中 29 个共有峰峰面积导入 SIMCA-P14.1，以 29 个共有峰作为变量，综合评价 OPLS-DA 模型的 3 个指标：R^2x = 0.909，R^2y = 0.677，Q^2 = 0.593，均大于 0.5，说明预测模型有效，山西和陕西、内蒙古和河北可以得到有效区别，见图 6，与 PCA 结果一致。

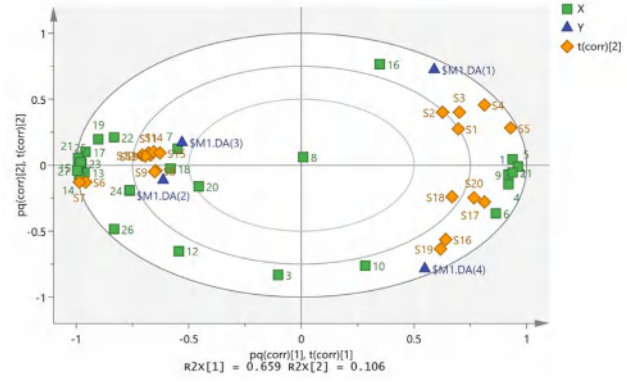


图 6 远志的 OPLS-DA 图

Fig 6 OPLS-DA of *Polygala Tenuifolia*

结合 VIP 值进行关联分析，见图 7。VIP 值越小，成分体现药材共性的重要性越大，按 VIP 值由小到大可筛选出组间具有共性的标志性成分，即图中靠右侧的成分（1 号峰，西伯利亚远志糖 A5）体现远志药材共性的重要性最大；20，26，10，22，15，6，13，11，7 号峰尚未指认到具体成分；9 号峰（3，6'- 二芥子酰基蔗糖）、2 号峰（西伯利亚远志糖 A6）和 4 号峰（远志叫酮Ⅲ）VIP 值均较小，能较好地体现远志药材共性，适宜作为远志药材的 Q-marker。

2.2.8 远志药材 Q-marker 的含量测定 分别精密称取 20 批远志样品，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，并按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，结合网络药理学筛选结果、成分可测性和共有成分重要性贡献度，选择计算西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3，6'- 二芥子酰基蔗糖和远志

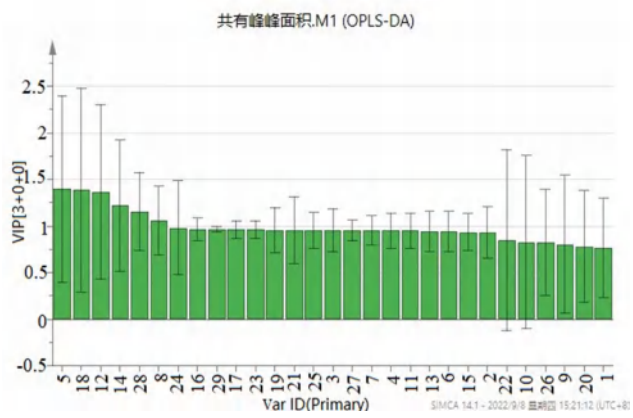


图 7　远志指纹图谱共有峰的 VIP 值

Fig 7　VIP of common peaks in *Polygala Tenuifolia* fingerprints

叫酮Ⅲ含量，结果见表 3，表明 3，6'- 二芥子酰基蔗糖是各产地远志样品中含量最高的化学成分。

表 3　20 批远志样品中各成分的含量

Tab 3　Content of 20 batches of *Polygala Tenuifolia*

样品	质量分数 /（mg・g^{-1}）			
	西伯利亚远志糖 A5	西伯利亚远志糖 A6	3，6'- 二芥子酰基蔗糖	远志叫酮Ⅲ
S1	0.32	1.44	102.24	1.44
S2	0.31	1.52	122.02	1.54
S3	0.31	1.53	117.92	1.45
S4	0.28	1.36	115.39	1.26
S5	0.28	1.43	109.67	1.41
S6	0.38	1.04	131.77	0.90
S7	0.38	1.01	131.44	0.83
S8	0.42	0.86	113.10	0.70
S9	0.42	0.87	113.30	0.65
S10	0.46	0.87	115.26	0.81
S11	0.46	0.88	115.57	0.77
S12	0.43	0.92	116.30	0.70
S13	0.43	0.92	116.35	0.75
S14	0.43	0.91	116.41	0.74
S15	0.43	0.91	116.88	0.74
S16	0.38	1.37	112.07	1.40
S17	0.35	1.23	93.24	1.24
S18	0.39	1.55	112.54	1.35
S19	0.39	1.58	112.33	1.48
S20	0.36	1.44	114.02	1.45

2.2.9　聚类分析　将远志指纹图谱中西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3，6'- 二芥子酰基蔗糖和远志叫酮Ⅲ的质量分数结果导入 IBM SPSS 21.0 软件，进行系统聚类分析，结果发现除 S1、S17 分为一类，其余 18 个批次归为一类，见图 8，说明不同产地远志药材中这 4 个成分差异性较小，验证了其能够体现远志药材的共性，适宜作为远志药材的 Q-marker。

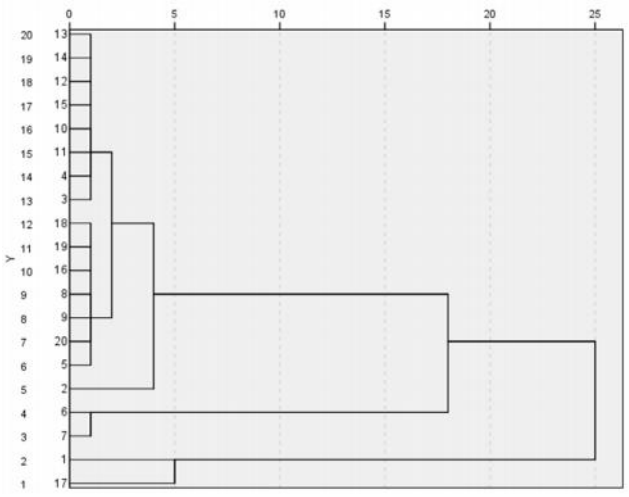


图 8　20 批远志药材的聚类分析

Fig 8　Cluster analysis of 20 batches of *Polygala Tenuifolia*

3　讨论

本文基于网络药理学，通过构建远志“活性成分 - 靶点 - 通路”网络，对远志抗抑郁的主要活性成分、关键靶点及潜在机制进行了分析。网络药理学筛选出 5 个可能是远志发挥抗抑郁作用的关键靶点，包括 IL2、VEGFA、HSP90AA1、APP、PLCG1。文献报道，抑郁症患者的免疫应激状态导致 IL2、IL6 水平升高，进而作用于单胺类神经递质，导致神经 - 内分泌 - 免疫网络失衡，抑郁症加重 [8]。血管内皮生长因子（VEGF）是生长因子家族的成员，与神经营养和神经发生有关，在大脑发育中起关键作用，一项动物研究发现，抗抑郁药物可诱导海马 VEGF 的表达，且抗抑郁药物诱导的细胞增殖需要通过 VEGF 信号传导 [9]。临床研究表明，中重度抑郁组肝癌患者 HSP90AA1/HSPA8 呈高表达，预后较差，可能与 VEGF/VEGFR2-PI3K-AKT 通路的激活有关 [10]。

通过分析“活性成分 - 靶点 - 通路”网络中的活性成分，筛选出 12 个重要成分，包括细叶远志皂苷、3，6'- 二芥子酰基蔗糖、瓜子金皂苷ⅩⅩⅠ、瓜子金皂苷ⅩⅩⅧ、西伯利亚远志叫酮 A、西伯利亚远志糖 A1、西伯利亚远志糖 A3、西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6 及远志叫酮等，这些活性成分可能是远志抗抑郁的潜在 Q-marker。近年来研究表明远志糖酯和叫酮类成分具有很好的神经细胞保护和抗抑郁作用 [11]，寡糖酯类化合物抗抑郁的作用机制包括细胞保护、内分泌调节、脑源性神经营养因子（BDNF）表达增加、改善单胺类神经元可塑性以及影响单胺类神经递质再摄取过程 [12]，其中，3，6'- 二芥子酰基蔗糖可通过激活细胞外调节蛋白激酶和钙调蛋白激酶两条信号通路发挥抗抑郁作用 [13]。黄晓舞等 [14] 发现富含西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6 的远志 30% 乙醇提取物能显著减少小鼠悬尾和强迫游泳不动时间，显示出较强的抗

抑郁作用。分子对接结果显示远志呫酮Ⅲ和西伯利亚远志糖 A1、A3、A5、A6 都能与 VEGFA、HSP90AA1、APP 很好地结合，西伯利亚远志呫酮 A 和 VEGFA 结合最好，西伯利亚远志呫吨酮 B 和 HSP90AA1 结合最好。Li 等 [15] 通过体内药效实验，发现瓜子金总皂苷具有良好的抗抑郁活性，且呈现抗抑郁药特有的倒 U 型剂量依赖关系。王洪兰等 [16] 采用小鼠悬尾实验、强迫游泳实验，发现瓜子金皂苷ⅩⅩⅠ呈现出与阳性药氟西汀相当的抗抑郁作用。分子对接结果显示瓜子金皂苷ⅩⅩⅠ和瓜子金皂苷ⅩⅩⅧ与关键靶标强烈结合，很可能是远志抗抑郁的药效物质。

对网络中的通路进行分析，Rap-1 信号通路参与抑郁症过程 [17]；Ras 相关信号通路通过间接影响神经营养因子或者直接影响神经可塑性参与抑郁症的发生和发展 [18]；有研究结果表明 miR-107 的下调通过缺氧诱导因子 1α（HIF-1α）发挥作用，介导 VEGF 依赖性海马脊髓生成，从而发挥抗抑郁作用 [19]；PI3K-Akt 信号通路是 BDNF/TrkB（酪氨酸激酶受体 B）的下游信号通路，在细胞中广泛存在，是介导多种生长因子促存活的重要通路，被认为是治疗抑郁症的重要级联信号通路 [20]。

本研究结合指纹图谱、化学模式识别及含量测定结果分析，发现西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3，6'- 二芥子酰基蔗糖和远志呫酮Ⅲ含量高、可测性好，能有代表性地体现不同批次远志药材的共性，适合作为远志的潜在 Q-marker。因此本实验选择这 4 个成分作为远志抗抑郁作用的 Q-marker 成分，为远志质量标准的提升及质量控制提供参考。本研究虽预测了远志的 Q-marker，但对成分的指认及有效性有待进一步验证，后期将对 Q-marker 的药效活性及作用机制进行进一步的验证和阐释。

参考文献

[1] 过伟峰，曹晓岚，盛蕾，等 . 抑郁症中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志，2020，40（2）：141-148.

[2] 余楷杰，巩子汉，杨婧雯，等 . 基于网络药理学和实验验证探讨二仙汤及其温肾拆方治疗抑郁症的可行性 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（16）：211-223.

[3] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：163.

[4] 陈启军，于岚，赵文文，等 . 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群的作用研究 [J]. 中草药，2021，52（8）：2313-2323.

[5] 刘屏，王东晓，郭代红，等 . 远志 3，6'- 二芥子酰基蔗糖在药物诱发抑郁模型上的药效评价 [J]. 中国药学杂志，2008，43（18）：1391-1394.

[6] 王立琴，朱树贞，李德梅 . 细叶远志皂甙对抑郁小鼠精神行为影响 [J]. 中国公共卫生，2020，36（4）：570-573.

[7] 刘昌孝 . 中药质量标志物（Q-Marker）研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药，2021，52（9）：2511-2518.

[8] 江鸿波，李莉欣 . 抑郁症与强迫症患者治疗前后血清脑源性神经营养因子、白介素 -2 及白介素 -6 水平变化及其临床意义 [J]. 实用临床医药杂志，2013，17（1）：37-40.

[9] Tsai SJ，Hong CJ，Liou YJ，et al. Haplotype analysis of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor（VEGFA）gene and antidepressant treatment response in major depressive disorder [J]. Psychiatry Res，2009，169（2）：113-117.

[10] 韦珏伶，吴飞翔，游雪梅，等 . HSP90AA1/HSPA8 在合并抑郁情绪的肝癌患者中的表达及临床意义 [D]. 南宁：广西医科大学，2019.

[11] 杨学东，徐丽珍，杨世林 . 远志属植物中呫酮类成分及其药理研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2000，12（5）：88-94.

[12] 章主恒，王静，付宇，等 . 中药远志抗抑郁有效成分及其作用机制研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志，2018，24（12）：1797-1801.

[13] Hu Y，Liu MY，Liu P，et al. Neuroprotective effects of 3，6'-disinapoyl sucrose through increased BDNF levels and CREB phosphorylation via the CaMKⅡ and ERK1/2 pathway [J]. J Mol Neurosci，2014，53（4）：600-607.

[14] 黄晓舞，谢婷婷，王东晓，等 . 远志醇提物的抗抑郁作用 [J]. 中国药物应用与监测，2007，4（4）：22-25.

[15] Li TZ，Zhang WD，Yang GJ，et al. Saponins from *Polygala japonica* and their effects on a forced swimming test in mice [J]. J Nat Prod，2006，69（4）：591-594.

[16] 王洪兰，王怡然，周荧，等 . 植物药瓜子金抗抑郁活性部位初步研究 [J]. 现代中药研究与实践，2015，29（1）：32-34，38.

[17] Dwivedi Y，Mondal AC，Rizavi HS，et al. Differential and brain region-specific regulation of Rap-1 and Epac in depressed suicide victims [J]. Arch Gen Psychiat，2006，63（6）：639-648.

[18] 王凡，张晨，方贻儒 . Ras 信号通路与抑郁症神经可塑性机制 [J]. 上海交通大学学报（医学版），2015，35（10）：1556-1559.

[19] Huang YF，Yang CH，Huang CC，et al. Vascular endothelial growth factor-dependent spinogenesis underlies antidepressant-like effects of enriched environment [J]. J Biol Chem，2012，287（49）：40938-55.

[20] 吴丹，高耀，向欢，等 . PI3K/Akt 信号通路在抑郁症及抗抑郁中药作用机制研究中的进展 [J]. 中草药，2019，50（18）：4461-4469.

（收稿日期：2022-10-01；修回日期：2022-12-06）

大蒜素通过抑制内质网应激减轻血管性痴呆大鼠海马神经元损伤

陈晨[1]，孙志涛[2]，张洪峰[1]（1.邯郸市中心医院科研科，河北　邯郸　056008；2.邯郸市第二医院心内一科，河北　邯郸　056001）

摘要：目的　研究大蒜素对血管性痴呆（VD）大鼠海马神经元损伤及内质网应激（ERS）的影响。**方法**　取 120 只实验用大鼠随机分为 6 组（n = 20）：假手术组，模型组，尼莫地平组和低、中、高剂量大蒜素组。除假手术组外，其他 5 组通过结扎双侧颈总动脉构建 VD 大鼠模型。低、中、高剂量大蒜素组分别 1 次·d^{-1} 灌胃 5、10、20 mg·kg^{-1}，尼莫地平组 1 次·d^{-1} 灌胃 2 mg·kg^{-1}，假手术组和模型组 1 次·d^{-1} 灌胃生理盐水。2 周后，进行神经症状评分，HE、TUNEL 染色法观察海马神经元病理性变化以及神经元凋亡情况，ELISA 法检测海马组织炎症因子（TNF-α、IL-1β 和 IL-6）水平，Western blot 法检测 ERS 相关蛋白和核因子 -κB p65（NF-κB p65）、Caspase-12 及 Caspase-3 蛋白表达。**结果**　与模型组比较，中、高剂量大蒜素组和尼莫地平组大鼠神经症状评分显著降低（P < 0.05）；海马神经元病理性改变和神经元凋亡状况明显好转；海马组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量显著降低（P < 0.05），葡萄糖调控蛋白 78（GRP78）、C/EBP 同源蛋白（CHOP）、NF-κBp65、Caspase-12、Caspase-3 相对表达量和内质网激酶磷酸化率（p-PERK/PERK）显著降低（P < 0.05）。与尼莫地平组比较，高剂量大蒜素组神经症状评分和 TNF-α、IL-6 含量显著降低（P < 0.05），GRP78、CHOP、NF-κBp65、Caspase-3 相对表达量和 PERK 磷酸化率显著降低（P < 0.05）。**结论**　大蒜素可减轻 VD 大鼠海马神经元凋亡和炎症损伤，其可能的作用机制是抑制 ERS。

关键词：大蒜素；血管性痴呆；内质网应激；海马神经元；炎症；凋亡
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1827-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.022

A llicin reduce the damage of hippocampal neurons in rats with vascular dementia by inhibiting endoplasmic reticulum stress

CHEN Chen[1], SUN Zhi-tao[2], ZHANG Hong-feng[1] (1. *Department of Scientific Research, Handan Central Hospital, Handan Hebei* 056008; 2. *No.1 Department of Cardiology, Handan Second Hospital, Handan Hebei* 056001)

Abstract: Objective　To determine the effect of allicin on the hippocampal neuronal damage and endoplasmic reticulum stress (ERS) in rats with vascular dementia (VD). **Methods**　Totally 120 experimental rats were randomly divided into 6 groups (n = 20): a sham operation groups, a model group, a nimodipine group and allicin low, medium, high dose groups. The rat model with VD was established by ligating bilateral common carotid arteries in all groups except the sham operation group. The low, medium, high dose allicin groups were respectively given 5, 10, and 20 mg·kg^{-1} by gavage once a day, the nimodipine group was given 2 mg·kg^{-1} by gavage once a day, while the sham operation group and the model group were given normal saline by gavage once a day. Two weeks later, the nerve symptom was scored; the pathological changes and apoptosis of the hippocampal neurons were observed through HE and TUNEL staining; the level of inflammatory factors (TNF-α, IL-1β and IL-6) in the hippocampus were detected by ELISA; the expression of ERS related proteins and nuclear factor-

基金项目：邯郸市科学技术研究与发展计划（No. 1823208039ZC）。
作者简介：陈晨，女，主管药师，主要从事医院药学研究，email：1388097@163.com

κB p65 (NF-κB p65), Caspase-12 and Caspase-3 were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the nerve symptom scores of the rats in the medium and high dose allicin groups and the nimodipine group were significantly decreased ($P < 0.05$); the pathological changes of the hippocampal neurons and neuronal apoptosis were significantly improved; the levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 in the hippocampus were significantly decreased ($P < 0.05$); and the relative expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), NF-κB p65, Caspase-12, Caspase-3 and the phosphorylation rate of PERK (p-PERK/PERK) were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the nimodipine group, the nerve symptom scores and the level of TNF-α and IL-6 in the high dose allicin group were significantly decreased ($P < 0.05$), the relative expression of GRP78, CHOP, NF-κB p65, Caspase-3 and the phosphorylation rate of PERK were also significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Allicin can reduce the apoptosis and inflammatory damage of the hippocampal neurons in VD rats, whose mechanism may be related to the inhibition of ERS.

Key words: allicin; vascular dementia; endoplasmic reticulum stress; hippocampal neuron; inflammation; apoptosis

血管性痴呆（vascular dementia，VD）是一种认知功能障碍综合征，以记忆缺失、思维障碍、智力减退等为主要临床表现，目前全球约 3600 万人受 VD 困扰，并且其发病率呈逐年上升趋势 [1]。脑组织血液循环障碍所致脑认知功能区神经元损伤是引发 VD 的重要因素，海马是负责认知的脑功能区 [2]。VD 病理机制复杂，已有研究显示炎症反应和海马神经元凋亡在 VD 的疾病进展过程中具有关键性作用 [3-4]。

大蒜是药食两用的百合科葱属植物，大蒜素是其主要活性成分，研究显示大蒜素具有较好的抗炎和抗凋亡活性 [5-6]，但大蒜素能否通过抑制海马组织炎症损伤和神经元凋亡以延缓或逆转 VD 进展尚未见文献报道。内质网是一种膜性细胞器，在机体调控炎症反应、细胞凋亡等过程中发挥着关键作用 [7-8]。本实验将大蒜素作用于 VD 模型大鼠，以探讨大蒜素对 VD 大鼠海马神经元损伤及内质网应激（ERS）的影响。

1 材料

1.1 实验动物

120 只 SPF 级雄性 SD 大鼠 [河北省实验动物中心，许可证号 SYXK（冀）2018-004]，7 周龄，体质量（230±20）g，在控制环境 [室温（24±1）℃、湿度（60±5）%、光暗时间 12 h/12 h] 条件下分笼饲养。实验过程中遵循 3R 原则给予所有大鼠人道主义关怀。

1.2 试药

大蒜素胶囊（规格：20 mg/ 粒，批号：22A0409018，江苏正大清江制药有限公司）；尼莫地平片（规格：20 mg/ 片，批号：20211125，四川科伦药业股份有限公司）。TUNEL 染色试剂盒（批号：220704，南京建成生物工程研究所）；肿瘤坏死因子 -α（TNF-α，批号：PT516）、白细胞介素（IL）-1β（IL-1β，批号：PI303）、IL-6（批号：PI328）酶联免疫吸附法（ELISA）检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；葡萄糖调控蛋白 78（GRP78，批号：3418S）、内质网激酶（PERK，批号：5063S）、p-PERK（批号：5071S）、C/EBP 同源蛋白（CHOP，批号：4495S）、核因子 -κB p65（NF-κB p65，批号：4172S）、Caspase-12（批号：10365S）、Caspase-3（批号：6408S）、内参 β-actin（批号：35127S）抗体（美国 Cell Technology 公司）；BCA 法蛋白含量检测试剂盒（批号：PC0020）、ECL 显色试剂盒（批号：SW2030）（北京索莱宝生物技术有限公司）。

1.3 仪器

HM340E 石蜡切片机（德国 Thermo Scientific 公司）；CX31 型光学显微镜（日本 Olympus 公司）；Labofuge 400R 型低温离心机（德国 Thermo Electron 公司）；MK3 型全自动多功能酶标仪（芬兰雷勃公司）；DYCZ-24DN 型电泳仪、DYCZ-40D 型转膜仪（北京六一生物科技有限公司）；CFX 型凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

按照随机数字表法将 120 只大鼠平均分为 6 组（$n = 20$）：假手术组，模型组，尼莫地平组和低、中、高剂量大蒜素组。除假手术组外，其

他 5 组均参照文献[9]报道的方法，通过结扎双侧颈总动脉构建 VD 大鼠模型。造模完成后，低、中、高剂量大蒜素组分别 1 次 • d^{-1} 灌胃 5、10、20 mg • kg^{-1}（参照人临床剂量，根据人与大鼠剂量换算公式计算所得，低、中、高剂量分别相当于人剂量的 1/2、1 倍、2 倍），尼莫地平组 1 次 • d^{-1} 灌胃 2 mg • kg^{-1}（参照人临床剂量，根据人与大鼠剂量换算公式计算所得），假手术组和模型组 1 次 • d^{-1} 灌胃生理盐水，疗程 2 周。

2.2　神经症状评分

各组随机取 10 只大鼠，参照苗明三等[10]报道的评分标准，分别从活动、步态、进食、饮水、疼痛刺激反应五个方面进行评分：① 活动：自发探究计 0 分，刺激时走动计 1 分，爬行计 2 分，不动计 3 分；② 步态：正常计 0 分，共济失调计 1 分，爬行计 2 分，无步态计 3 分；③ 进食：正常计 0 分，少量计 1 分，无饮食计 2 分；④ 饮水：有计 0 分，无计 1 分；⑤ 疼痛刺激反应：疼痛刺激时移动 / 走动计 0 分，头 / 躯干动或反应过强计 1 分，肢体回缩计 2 分，无反应计 3 分。

2.3　HE 染色法行海马神经元病理学检查

神经症状评分完成后，40 mg • kg^{-1} 腹腔注射戊巴比妥钠实施麻醉，颈椎脱臼处死，取脑组织置于 10% 中性甲醛溶液固定 5 d，经石蜡包埋、4 μm 切片、烤片、水化处理后行 HE 染色，置于显微镜下观察海马神经元的病理学变化并拍照。

2.4　TUNEL 染色法观察海马神经元凋亡状况

取“2.3”项下制备的脑组织石蜡切片，水化处理后行 TUNEL 染色，显微镜下观察海马神经元凋亡状况。每张切片取 5 个视野，对神经元总数和凋亡神经元数进行计数，然后计算凋亡指数（视野内凋亡神经元数占神经元总数的百分比，AI）。

2.5　ELISA 法检测海马组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量

取各组剩余的 10 只大鼠，40 mg • kg^{-1} 腹腔注射戊巴比妥钠实施麻醉，颈椎脱臼处死，取脑并剥取海马组织，加入 9 倍量 4 ℃裂解液、研磨匀浆，4 ℃、3000 r•min^{-1} 离心 5 min 取上清液，按照 ELISA 试剂盒说明通过酶标仪检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量。

2.6　Western blot 法检测海马组织蛋白表达

取海马组织匀浆液，4 ℃、6000 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液，于 4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 30 min，取沉淀，BCA 法测定蛋白浓度、沸水浴变性，10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白、转膜、室温封闭 1 h 后，用 GRP78、PERK、p-PERK、CHOP、NF-κB p65、Caspase-12、Caspase-3、内参 β-actin 一抗稀释液 4 ℃孵育过夜，洗膜后二抗室温孵育 1.5 h，ECL 显色后，通过 Image J 软件检测蛋白条带的灰度值。

2.7　统计学方法

运用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析，计量资料符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示，分别采用单因素方差分析和 LSD-t 检验进行多组间均数比较和进一步两两比较，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　大蒜素对 VD 大鼠神经症状评分的影响

与假手术组比较，模型组神经症状评分升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，中、高剂量大蒜素组和尼莫地平组神经症状评分降低（$P < 0.05$）；与尼莫地平组比较，高剂量大蒜素组神经症状评分降低（$P < 0.05$）（见图 1）。

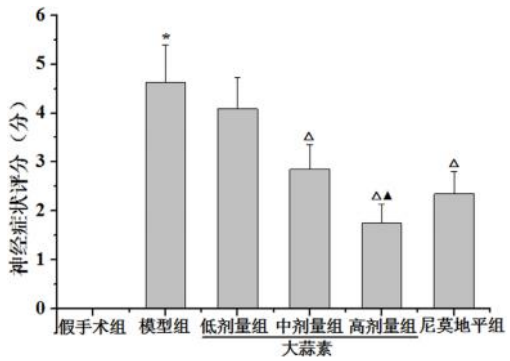


图 1　大蒜素对 VD 大鼠神经症状评分的影响（$n = 10$）

Fig 1　Effect of allicin on neurological symptom score of VD rats（$n = 10$）

注：与假手术组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{△}P < 0.05$；与尼莫地平组比较，$^{▲}P < 0.05$。

Note：Compared with the sham operation group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{△}P < 0.05$；compared with the nimodipine group，$^{▲}P < 0.05$.

3.2　大蒜素对 VD 大鼠海马神经元病理学变化的影响

假手术组大鼠海马神经元结构完整，排列整齐、层次清晰；模型组海马神经元呈现排列紊乱、层次不清、间隙增大、胞体固缩、核膜边界不清、炎性细胞浸润等病理学变化；与模型组比较，低、中、高剂量大蒜素组和尼莫地平组 VD 大鼠海马神经元病理学结构呈不同程度好转，高剂量大蒜素组效果优于其他组（见图 2）。

3.3　大蒜素对 VD 大鼠海马神经元凋亡的影响

与假手术组比较，模型组海马神经元凋亡数量增多，AI 升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，中、高剂量大蒜素组和尼莫地平组海马神经元凋亡数

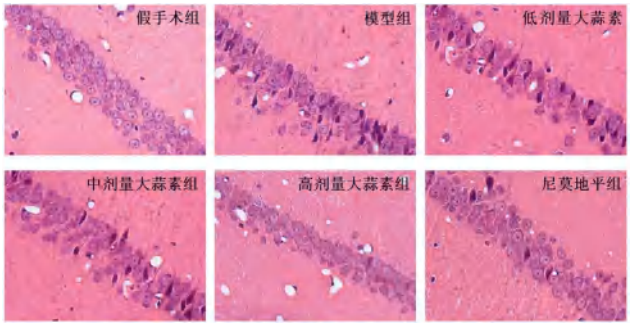


图 2 大蒜素对 VD 大鼠海马神经元病理学变化的影响（HE，×400）

Fig 2 Effect of allicin on pathological change of hippocampal neurons of VD rats（HE，×400）

量均减少，AI 均降低（$P < 0.05$）；与尼莫地平组比较，高剂量大蒜素组 AI 降低（$P < 0.05$）（见图 3 及图 4）。

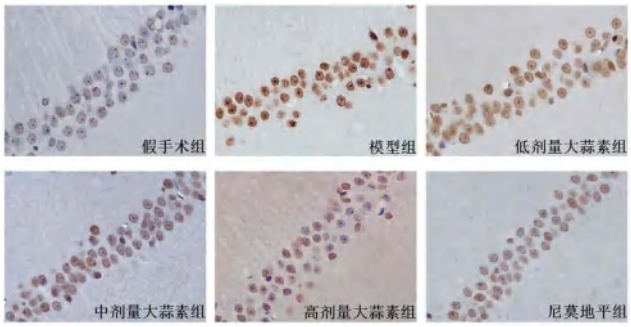


图 3 大蒜素对 VD 大鼠海马神经元凋亡的影响（TUNEL，×400）

Fig 3 Effect of allicin on apoptosis of hippocampal neurons of VD rats（TUNEL，×400）

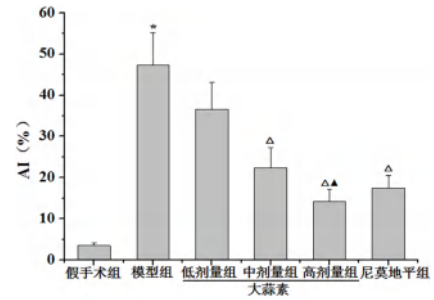


图 4 大蒜素对 VD 大鼠海马神经元 AI 的影响（$n = 10$）

Fig 4 Effect of allicin on AI in hippocampal neurons of VD rats（$n = 10$）

注：与假手术组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{\triangle}P < 0.05$；与尼莫地平组比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$。

Note：Compared with the sham operation group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\triangle}P < 0.05$；compared with the nimodipine group，$^{\blacktriangle}P < 0.05$.

3.4 大蒜素对 VD 大鼠海马组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量的影响

与假手术组比较，模型组 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，中、高剂量大蒜素组和尼莫地平组 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量降低（$P < 0.05$）；与尼莫地平组比较，高剂量大蒜素组 TNF-α、IL-6 含量降低（$P < 0.05$）（见图 5）。

3.5 大蒜素对 VD 大鼠海马组织 GRP78、PERK、p-PERK、CHOP 蛋白表达及 PERK 磷酸化率（p-PERK/PERK）的影响

与假手术组比较，模型组 GRP78、CHOP 相对表达量和 p-PERK/PERK 升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，中、高剂量大蒜素组和尼莫地平组 GRP78、CHOP 相对表达量和 p-PERK/PERK 降低（$P < 0.05$）；与尼莫地平组比较，高剂量大蒜素组 GRP78、CHOP 相对表达量和 p-PERK/PERK 降低（$P < 0.05$）（见图 6 及图 7）。

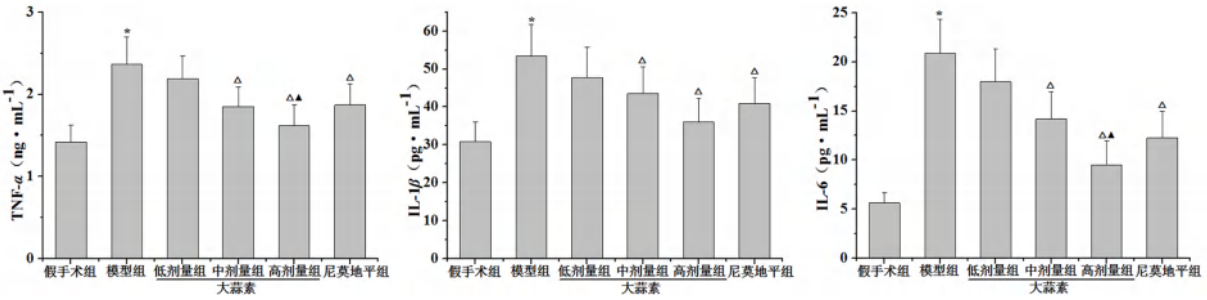


图 5 大蒜素对 VD 大鼠海马组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量的影响（$n = 10$）

Fig 5 Effect of allicin on TNF-α，IL-1β，IL-6 in hippocampus of VD rats（$n = 10$）

注：与假手术组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{\triangle}P < 0.05$；与尼莫地平组比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$。

Note：Compared with the sham operation group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\triangle}P < 0.05$；compared with the nimodipine group，$^{\blacktriangle}P < 0.05$.

3.6 大蒜素对 VD 大鼠海马组织 NF-κB p65、Caspase-12 及 Caspase-3 蛋白表达的影响

与假手术组比较，模型组 NF-κB p65、Caspase-12 及 Caspase-3 相对表达量升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，中、高剂量大蒜素组和尼莫地平组 NF-κB p65、Caspase-12、Caspase-3 相对表达量降低（$P < 0.05$）；与尼莫地平组比较，高剂量大蒜素组 NF-κB p65、Caspase-3 相对表达量降低（$P < 0.05$）（见图 8 及图 9）。

4 讨论

VD 在中医属于“呆病”“痴症”“善忘”等范畴，其主要病机在于“气血不足、肾精亏虚、痰浊

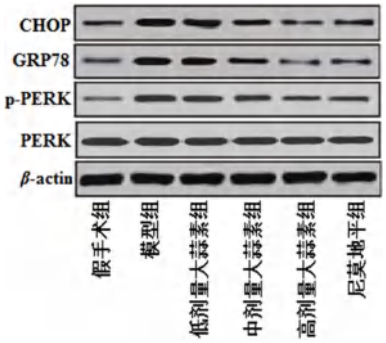


图 6　大蒜素对 VD 大鼠海马组织 GRP78、PERK、p-PERK 及 CHOP 蛋白表达的影响

Fig 6　Effect of allicin on the expression of GRP78，PERK，p-PERK，and CHOP proteins in hippocampus of VD rats

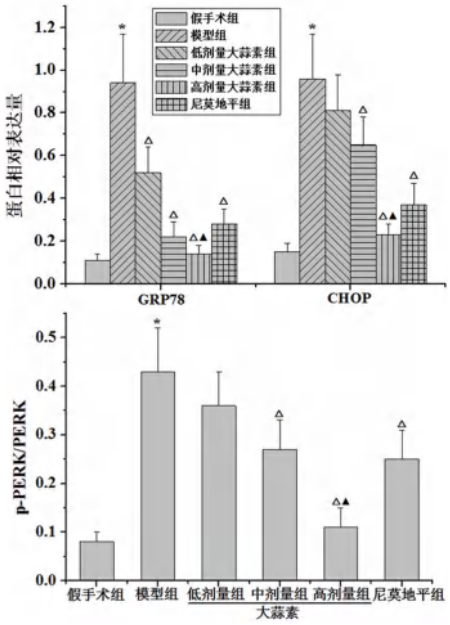


图 7　大蒜素对 VD 大鼠海马组织 GRP78 及 CHOP 蛋白相对表达量和 p-PERK/PERK 的影响（$n = 10$）

Fig 7　Effect of allicin on the relative expression of GRP78 and CHOP protein and p-PERK/PERK in hippocampus of VD rats（$n = 10$）

注：与假手术组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{\triangle}P < 0.05$；与尼莫地平组比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$。

Note：Compared with the sham operation group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\triangle}P < 0.05$；compared with the nimodipine group，$^{\blacktriangle}P < 0.05$.

瘀血”，宜采取益气活血、祛痰化瘀的方案治疗。大蒜具有补气消积、解毒杀虫、散痈肿毒疮等功效，其主要活性成分为大蒜素，既往文献报道大蒜素对出血性和缺血性脑损伤具有保护作用[11-12]。本研究发现，经大蒜素治疗 2 周能够明显降低 VD 大鼠神经症状评分，改善海马神经元病变，高剂量大蒜素组效应优于尼莫地平组，提示大蒜素对 VD 大鼠海马神经元损伤具有保护作用。

黑悦等[13]研究发现，脑血流障碍发生后将迅速激活小胶质细胞并释放炎症因子 IL-1β，

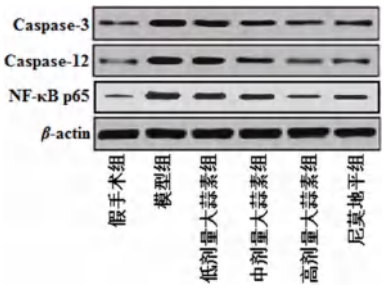


图 8　大蒜素对 VD 大鼠海马组织 NF-κB p65、Caspase-12、Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig 8　Effect of allicin on expression of NF-κB p65，Caspase-12，and Caspase-3 proteins in hippocampus of VD rats

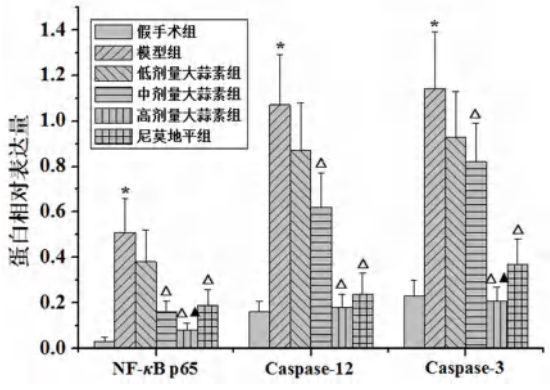


图 9　大蒜素对 VD 大鼠海马组织 NF-κB p65、Caspase-12、Caspase-3 蛋白相对表达量的影响（$n = 10$）

Fig 9　Effect of allicin on the relative expression of NF-κB p65，Caspase-12，and Caspase-3 protein in hippocampus of VD rats（$n = 10$）

注：与假手术组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{\triangle}P < 0.05$；与尼莫地平组比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$。

Note：Compared with the sham operation group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\triangle}P < 0.05$；compared with the nimodipine group，$^{\blacktriangle}P < 0.05$.

IL-1β 通过诱导白细胞黏附与浸润，引发炎症反应继而加重脑组织损伤。与此同时，IL-1β 激活巨噬细胞、单核细胞等，进而合成与分泌 TNF-α 等炎症趋化因子。研究显示，TNF-α 可以使内皮细胞通透性增加，诱导黏附因子合成与释放，并且 TNF-α 协同 IL-1β 诱导其他炎症因子生成，从而激发炎症级联反应[14]。IL-6 被认为是 VD 的生物学标志物，能够诱导白细胞黏附并造成微循环障碍，加重脑组织损伤[15]。细胞凋亡受多种基因调控，研究表明 Caspase-12、CHOP 等可激活 Caspase-3，激活型 Caspase-3 通过酶解切割细胞结构蛋白和修复蛋白参与细胞凋亡的启动和执行过程[16]。本研究发现，经大蒜素治疗 2 周能够明显降低 VD 大鼠海马组织炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量，改善海马神经元凋亡状况，下调 Caspase-12、CHOP 和 Caspase-3 表达，高剂量大蒜素组下调 CHOP、Caspase-3 表达的作用优于尼

莫地平组，提示大蒜素对 VD 大鼠海马神经元起到保护作用可能是通过抑制炎症损伤和神经元凋亡来实现的。

内质网对蛋白折叠等生理过程具有重要调控作用，脑血流障碍所致能量代谢受阻等导致内质网功能受损，致使蛋白不折叠或折叠错误，刺激内质网启动自我修复机制，即 ERS。ERS 通过诱导 PERK 磷酸化（p-PERK）和内质网伴侣蛋白 GRP78 表达，从而抑制叠错错误蛋白生成和促进折叠错误蛋白修复。若折叠错误蛋白累积过多而超过内质网修复能力时，将刺激 Caspase-12、CHOP 表达上调并激活 Caspase-3，从而启动细胞凋亡程序 [17-18]。此外，ERS 可刺激 NF-κB 大量表达，刘冲等 [19] 研究发现 NF-κB 分子中 p65 亚基与 DNA 特异位点结合后可使 TNF-α、IL-1β、IL-6 等炎症因子的表达增加，介导发生炎症反应。李红霞等 [20] 研究发现大蒜素能够通过抑制 ERS，减轻心肌缺血再灌注损伤。本研究发现，经大蒜素治疗 2 周能够明显下调 VD 大鼠海马组织 GRP78、NF-κB p65 蛋白表达，降低 p-PERK/PERK，高剂量大蒜素组上述效应优于尼莫地平组，提示大蒜素可能通过抑制 ERS 以减轻 VD 大鼠海马组织炎症反应和神经元凋亡。

综上，大蒜素可减轻 VD 大鼠海马神经元凋亡和炎症损伤，作用机制可能与抑制 ERS 有关，本研究结果为大蒜素作为 VD 治疗候选药物提供了实验依据。本研究仍存在不足之处：首先，所用实验动物均为雄性，以排除雌激素和孕激素对结果的影响，未能阐明本实验结果是否适用于雌性动物；其次，未设置 ERS 抑制剂组、激活剂组及其与大蒜素联合干预组，以验证 ERS 的特异性作用。课题组下一步拟对本研究中的不足之处进行深入探讨。

参考文献

[1] Vinters HV，Zarow C，Borys E，et al. Review：vascular dementia：clinicopathologic and genetic considerations [J]. Neuropathol Appl Neurobiol，2018，44（3）：247-266.

[2] 王保平，张圆，陈怡名，等 . 龙首参葛丸对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区组织结构变化的影响 [J]. 西部中医药，2019，32（6）：6-9.

[3] 陈粤瑛，宋晓楠，杨树龙 . 炎症相关因子在血管性痴呆发病机制中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报，2019，35（7）：693-699.

[4] 张杰，马云枝 . 复智胶囊对血管性痴呆模型大鼠海马神经元细胞凋亡时效的影响 [J]. 中医学报，2019，34（3）：551-554.

[5] 沈金峰，胡良伟，胡芳，等 . 大蒜素抑制慢性肾衰竭大鼠炎症反应 [J]. 广州中医药大学学报，2022，39（2）：375-381.

[6] 胡爽，郜振彦，应晓兰，等 . 大蒜素对幼年铅中毒大鼠海马细胞凋亡损伤的抑制作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志，2018，33（21）：1652-1656.

[7] 姜栩恒，葛红飞，倪宇，等 . 脑出血后内质网应激介导炎症反应的研究现状 [J]. 中华神经医学杂志，2019，18（11）：1164-1167.

[8] 张利平，孟燕，元小冬，等 . 内质网应激及介导细胞凋亡信号转导研究进展 [J]. 生物医学工程与临床，2018，22（2）：214-220.

[9] 从琳，张智龙 . 双侧颈总动脉闭塞法制作血管性痴呆大鼠模型的行为学动态评估 [J]. 实验动物与比较医学，2020，40（1）：22-27.

[10] 苗明三，项丽玲，苗艳艳，等 . 短暂性脑缺血发作动物模型规范（草案）[J]. 中华中医药杂志，2019，34（4）：1573-1577.

[11] 赵军苍 . 大蒜素对脑出血大鼠脑组织保护作用的研究 [J]. 现代中西医结合杂志，2021，30（4）：353-359.

[12] 黄冬冬，刘冬梅，孙汝智，等 . 大蒜素对全脑缺血再灌注大鼠脑保护机制的研究 [J]. 现代生物医学进展，2015，15（35）：6848-6851.

[13] 黑悦，魏礼洲，依西才，等 . 高迁移率族蛋白 1 拮抗剂 BoxA 对血管性痴呆大鼠急性期海马区域神经炎症的抑制作用 [J]. 现代生物医学进展，2019，19（9）：1618-1623.

[14] 汪效松，汪银洲，张旭，等 . 雷公藤氯内酯醇对血管性痴呆模型大鼠海马炎症因子及β淀粉样蛋白表达的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2017，33（24）：2584-2587.

[15] 付佳宇，刘宏雁，于玮炜 . 血栓心脉宁对血管性痴呆大鼠学习记忆功能与脑组织炎症因子表达的影响 [J]. 中药药理与临床，2019，35（1）：149-154.

[16] 袁美玲，张云，王艳，等 . 羟基红花红色素 A 抑制氧化应激和细胞凋亡改善 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤 [J]. 中南药学，2022，20（1）：1-7.

[17] 王伟 . 丹参多酚酸对大鼠脑缺血再灌注内质网应激的影响 [J]. 中国老年保健医学，2018，16（1）：52-54.

[18] 克迪热亚·卡地尔，祖力皮亚·阿布拉，马红梅，等 . 基于 PERK-ATF4-CHOP 通路探讨马里苷对高糖高脂诱导胰岛β细胞损伤的影响 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1316-1321.

[19] 刘冲，杨旭，沈娜，等 . 小檗碱抑制内质网应激炎症通路对 2 型糖尿病大鼠局部脑缺血再灌注损伤的探讨 [J]. 中华老年医学杂志，2020，39（1）：73-77.

[20] 李红霞，俞飞虎，代小兰，等 . 大蒜素通过抑制内质网应激减轻心肌缺血再灌注损伤的实验研究 [J]. 中国中医药科技，2022，29（2）：201-205.

（收稿日期：2022-10-27；修回日期：2023-03-15）

具备“壳 - 核”结构的 pH/GSH 双响应叠层载药胶束递送系统的研究

许小艺[1]，严菲[1*]，黄朝瑜[1]，吴正红[2]（1. 江苏省食品药品监督检验研究院，南京　210002；2. 中国药科大学药学院，南京　210002）

摘要：目的　设计一种具备酸、谷胱甘肽（GSH）双响应性的叠层胶束，用于靶向共递送阿霉素和姜黄素。**方法**　利用酰胺化反应将β-环糊精（β-CD）接枝于透明质酸（HA）侧链，作为外层“壳”载药位点（HA-CD），通过疏水作用包载阿霉素（DOX），形成 HA-CD@DOX；用二茂铁甲酸（Fc）与十八醇进行酯化反应，氧化处理后自组装得到正电性的内层促释性“核”（Fc^+-C18），包载抗肿瘤药物姜黄素（CUR），制得 Fc^+-C18@CUR。内层促释性“核”与外层“壳”通过静电作用结合，得到具备“壳 - 核”结构的叠层载药胶束（HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR）；通过 ^{1}H-NMR 对 HA-CD、Fc^+-C18 进行结构表征，采用 FT-IR 表征 HA-CD@DOX；采用芘荧光探针法对 Fc^+-C18 的临界胶束浓度进行测定；以动态光散射和透射电镜对叠层载药胶束粒径、形态进行表征；以高效液相色谱法（HPLC）和荧光分光光度法测定药物体外释放行为；采用 MTT 法考察 DOX 与 CUR 抗肿瘤的协同作用以及叠层载药胶束对肿瘤细胞（4T1）与正常细胞（LO2）增殖的抑制效果；以激光共聚焦显微镜、流式细胞仪观察体外细胞摄取性。**结果**　HA-CD@DOX 成功制备；Fc^+-C18 临界胶束浓度为 0.02 mg•mL^{-1}，HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 为直径 300 nm 左右的球形结构；MTT 结果表明 DOX 与 CUR 联合使用确实具有协同作用，HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 对 4T1 的细胞增殖抑制效果优于 DOX ＋ CUR；细胞摄取实验显示 HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 可以主动靶向至肿瘤细胞表面 CD44 受体，并实现药物的定点快速释放。**结论**　HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 具有 pH 和 GSH 双响应的药物释放行为，能提高药物在肿瘤部位的积累，具有主动靶向性，同时还有协同抗肿瘤作用。

关键词：胶束；β-环糊精；透明质酸；主动靶向性；联合用药
中图分类号：R944　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1833-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.023

pH/GSH dual-response stacked drug delivery system with a "shell-and-core" structure

XU Xiao-yi[1], YAN Fei[1*], HUANG Chao-yu[1], WU Zheng-hong[2] (1. *Jiangsu Institute of Food and Drug Control, Nanjing* 210002; 2. *School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing* 210002)

Abstract: Objective　To design a dual-response stacked micelle with acid and glutathione (GSH) for the targeted co-delivery of adriamycin (DOX) and curcumin (CUR). **Methods**　β-cyclodextrin (β-CD) was grafted onto the hyaluronic acid (HA) side chain by amidation and acted as the outer shell of drug-loading site (HA-CD), which encapsulated DOX by hydrophobic interaction to form HA-CD@DOX. Ferrocene carboxylic acid (Fc) was esterified with octadecanol and self-assembled after oxidation to obtain a positively charged inner pro-release core (Fc^+-C18). The inner pro-release core and the outer shell were electrostatically bonded to obtain a shell-nucleus structure. ^{1}H-NMR was used to characterize the structure of HA-CD and Fc^+-C18. FT-IR was used to characterize HA-CD@DOX. The critical micelle concentration of Fc^+-C18 was determined by pyrene fluorescence probe method. The particle size and morphology of the stacked drug-loaded micelles were characterized by dynamic light scattering

作者简介：许小艺，女，药师，主要从事制剂研究及化学药品质量研究，email：2325696725@qq.com　*通信作者：严菲，女，副主任药师，主要从事化学药品质量标准研究，email：37931658@qq.com

and transmission electron microscopy. The in vitro release behavior of the drug was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and fluorescence spectrophotometry. The antitumor synergistic effect of DOX and CUR and the proliferation inhibition of stacked drug-loaded micelles on tumor cells (4T1) and normal cells (LO2) were investigated by MTT method. The proliferation inhibition of DOX and CUR was investigated. Laser confocal microscopy, and flow cytometry were used to observe the in vitro cellular uptake. **Results** HA-CD@DOX was successfully prepared; the critical micelle concentration of Fc^{+}-C18 was 0.02 mg • mL^{-1}, and HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR was a spherical structure with a diameter of about 300 nm. MTT showed that the combination of DOX and CUR did have a synergistic effect, and HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR had a better effect than DOX ＋ CUR on 4T1 cells. The cell uptake assay showed that HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR actively targeted CD44 receptors on the surface of tumor cells to achieve rapid release of the drug at a fixed point. **Conclusion** HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR shows a pH and GSH dual-response drug release behavior that enhances drug accumulation at tumor sites with active targeting, as well as a synergistic anti-tumor effect.

Key words: micelle; *β*-CD; hyaluronic acid; active targeting; medication combination

近年来，单一给药是药物载体研究的重点，但随着载药体系的不断完善和成熟，人们也寄希望于在药物协同使用上有所突破，共递送载药系统应运而生[1]。有研究表明，对于肿瘤细胞的治疗，双重给药比单一给药效果更好[2-3]，这为肿瘤的诊疗提供了一个新的契机。与此同时，传统的以单一化合物合成的载药体系具有初期药物释放速率快和功能单一的特点[4-5]，可能会导致局部血药浓度过高，造成药物中毒或治疗程度限制[6-8]。因此，两种化合物的联合使用可有效弥补上述缺点。相较于传统胶束的单层“壳 - 核”结构，经过修饰组合后的叠层“壳 - 核”结构，可通过外部的“壳”对内层药物分子的释放进行控制，以此降低药物的突释[9-11]。因此，本实验设计了具有叠层“壳 - 核”结构的共递送载药系统，如图 1 所示：透明质酸（HA）的引入赋予载体特异性识别肿瘤细胞表面过表达的 CD44 受体[12-14]及主动靶向至肿瘤部位的能力，同时在其侧链上修饰 *β*- 环糊精（*β*-CD），使其具备将阿霉素（DOX）包载于空腔内，以减少其在体循环中的释放能力；同时，将二茂铁的衍生物二茂铁甲酸与十八醇结合，氧化自组装形成阳离子促释性“内核”，并将化学增敏剂姜黄素（CUR）包载于“内核”中。外层“壳”与促释性“内核”通过静电作用结合，形成叠层共递送载药系统。在肿瘤组织微酸环境下，载体中的酰胺键水解，包载药物的环糊精从 HA 侧链脱落；而在高浓度谷胱甘肽（GSH）环境[15-16]中，促释性“核”（Fc^{+}-C18）被还原解体，CUR 释放，被还原的二茂铁基转化为疏水态，进而与 DOX 竞争环糊精空腔[17-18]，促进 DOX 在肿瘤细胞内快速释放。此叠层胶束具备了 pH 与 GSH 双重响应能力，保证有充足的药物能够到达肿瘤部位，确保联合治疗的协同效应以及改善抗肿瘤活性。

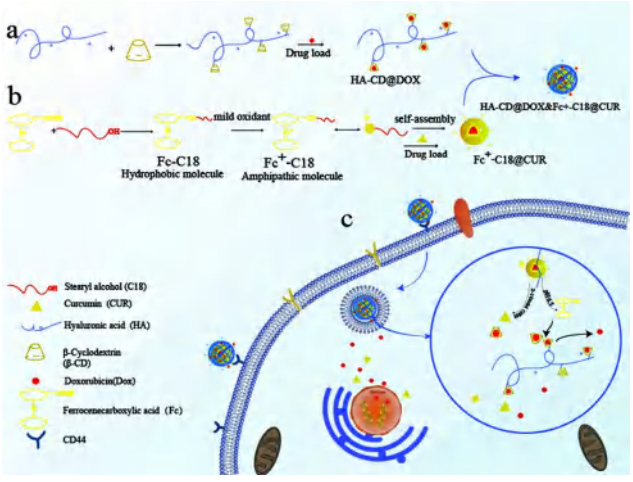


图 1 具备“壳 - 核”结构 pH/GSH 双响应叠层载药胶束递送系统用于肿瘤治疗的示意图

Fig 1 Shell-nucleus structured pH/GSH dual-response stacked micelle delivery system for tumor therapy

a. 透明质酸侧链修饰 *β*- 环糊精并包载 DOX（hyaluronic acid side chain modified *β*-cyclodextrin and DOX encapsulation）；b. 促释性阳离子胶束的制备及 CUR 的包载（preparation of pro-release cationic micelles and CUR encapsulation）；c. 叠层胶束通过 CD44 受体介导的内吞作用摄取至肿瘤细胞内并由 pH/GSH 触发药物的释放 [stacked micelles via CD44 receptor-mediated endocytosis uptake into tumor cells and drug release triggered by pH/GSH]

1 材料

1.1 试药

低分子透明质酸钠（华熙生物科技股份有限公司，相对分子质量为 3.4 kDa），*β*-CD（上海泰坦科技股份有限公司），CUR（上海源叶集团生物技术有限公司，纯度≥ 99.8%），盐酸阿霉素（浙

江海正医药股份有限公司，纯度≥ 99.8%），芘荧光探针 [西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司，纯度≥ 99.8%]，十八醇（上海凌峰化学试剂有限公司），二茂铁甲酸（纯度≥ 99.8%）及其他生化试剂（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。小鼠乳腺癌细胞（4T1 细胞）、人正常肝细胞（LO2 细胞）（美国菌种保藏中心）。

1.2 仪器

FD-1A-50 真空冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司），TENSOR 27 傅里叶变换红外光谱仪、德国布鲁克粒径测定仪（德国布鲁克公司），AVANED AV-300 核磁共振波谱仪（瑞士 BRUKER 公司），F280 荧光分光光度计（天津港东科技发展有限公司），LC-20 高效液相色谱仪（日本岛津公司），BD FACSCeleta 流式细胞仪（美国 BD 公司），LSM 700 激光共聚焦显微镜（Carl Zeiss Jene），Multiskan FC 多功能酶标仪（美国 Biotech 仪器公司），Hitachi 7700 透射电子显微镜（日本日立公司）。

2 方法

2.1 HA-CD 的合成及表征

透明质酸四丁基铵盐（HA-TBA）的合成与单 -6- 氧 - 对甲苯磺酰基 -β- 环糊精（Tos-β-CD）的合成路线参考文献 [19]。称取 5 g Tos-β-CD 和 20 g 1，6- 己二胺（HDA）于圆底烧瓶中，加入 25 mL *N*，*N*- 二甲基甲酰胺（DMF），在氮气保护下于 80 ℃水浴锅中搅拌反应 18 h。待反应结束，将反应液滴入 500 mL 冷丙酮中沉淀，抽滤得沉淀，再将其溶解于适量甲醇水溶液中，重复两次。40 ℃真空干燥沉淀得到氨基修饰的环糊精，记为 NH_2-β-CD。向圆底烧瓶中加入 1.25 g HA-TBA 和 1.5 g NH_2-β-CD。用氮气吹扫容器，通过注射器加入 60 mL 无水二甲基亚砜（DMSO）。待反应物完全溶解，通过注射器加入六氟磷酸苯并三唑 -1- 氧基三（二甲氨基）磷的 DMSO 溶液（0.53 g/3 mL），室温反应 2 h。反应液置入透析袋于蒸馏水中透析 48 h 纯化，冷冻干燥得到 HA-CD 冻干粉，产率为 30%。通过 ^{1}H 核磁共振波谱仪对 HA-CD 进行化学结构表征。

2.2 HA-CD@DOX 的制备及表征

精密称取 10 mg 的 HA-CD，2 mg 的 DOX 溶于适量 DMSO，室温下搅拌 24 h，透析，溶液冻干得 HA-CD@DOX。取真空干燥的 DOX、HA-CD、HA-CD 与 DOX 的物理混合物、HA-CD@DOX 各约 5 mg 与 200 mg KBr 粉末充分研磨混合，压片制样，用傅里叶红外光谱仪进行扫谱。

2.3 Fc-C18 的合成与结构表征

将 5.0 mg 二茂铁甲酸（Fc）溶于适量二氯甲烷中，加入 20 mg 4- 二甲氨基吡啶（DMAP）和 5 mg 十八醇。取 20 mg 1-（3- 二甲氨基丙基）-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）溶于适量二氯甲烷中，待全部溶解后滴加到上述反应液中。室温搅拌 24 h。透析，溶液冷冻干燥 48 h 得 Fc-C18，产率为 38%。通过 ^{1}H 核磁共振波谱仪对 Fc-C18 进行化学结构表征。

2.4 Fc^+-C18 胶束的表征及 Fc^+-C18@CUR 的制备

用三氯化铁的乙腈溶液氧化 Fc-C18，采用芘荧光探针法测定临界胶束浓度（CMC）。精密量取 2.0 mg 芘，溶于 10 mL 丙酮中，在每个样品瓶中加入 10 μL 该丙酮溶液，并置于通风橱中挥发丙酮。再另外配制系列质量浓度 Fc^+-C18（0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.0025、0.001 25、0.000 625 mg • mL^{-1}）。各取 3 mL 上述不同质量浓度的溶液于 10 mL 芘量瓶中，使得芘均匀分散其中。取适量的 Fc^+-C18、CUR 溶于 2 mL 的 DMSO 中，室温搅拌 24 h，透析 24 h，即得 Fc^+-C18@CUR。

2.5 叠层载药胶束的制备与表征

利用 HA-CD@DOX 的负电性与 Fc^+-C18@CUR 的正电性相互吸引的特点，将不同浓度比（*c*/*c* ＝ 1 ∶ 1、1 ∶ 2、1 ∶ 3）的溶液均匀混合即可得 HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR，并置于样品池中，用粒径电位仪测定其粒径、电位。再取适量叠层载药胶束溶液与经 GSH 溶液破坏后的叠层载药胶束溶液滴在表面附着碳膜的铜网上，于室温下静置 2 ～ 3 min，用吸水纸吸去多余的溶液后，用磷钨酸溶液负染 2 ～ 3 min，红外灯下干燥，置于 TEM 中以 80 kV 加速电压检视、拍照。

2.6 叠层载药胶束体外释放

采用透析法考察 HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 的体外释药行为。精密量取 1 mL HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 溶液于截留分子量 3500 Da 的透析袋中，透析夹夹紧，并置于 50 mL 含有 1% 吐温 80 的 pH 5.5、pH 6.5、pH 7.4 的 PBS 溶液中。将上述 3 种溶液置于恒温气浴摇床中振荡（37 ℃，100 r • min^{-1}），不同时间点用全新 3 mL 释放介质替换原有介质，以此考察不同 pH 条件对药物释放的影响；为了考察肿瘤细胞微环境中 GSH 对药物释放的影响，又增设了 3 个实验组，释放介质为 50 mL 含有 1% 吐温 80 的 GSH 浓度为 0、5、20 mmol • L^{-1} 的 pH 6.5 的 PBS 溶液，其余条件相同。用荧光分光光度法测定 DOX 在激发波长 503 nm 的荧光强度，用高效液相色谱法（HPLC）测定 CUR 在 428 nm 处的色谱峰

面积[20]，代入标准曲线换算浓度，计算累积释放率，绘制释放曲线。

2.7 细胞毒性和细胞摄取

用含 10% 胎牛血清、100 U·mL^{-1} 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基培养 4T1 细胞株（CD44 高表达）和人正常肝细胞 LO2 细胞株（CD44 低表达），置于 37 ℃、5%CO_2 的细胞培养箱中。取对数生长期细胞以 5.0×10^3 个 / 孔的密度接种于 96 孔板中，向各孔中分别加入一系列浓度梯度（按照 DOX 质量浓度为 0.039、0.078、0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5 和 10 μg·mL^{-1}，CUR 浓度梯度与其相同）的游离 DOX、CUR、DOX ＋ CUR、HA-CD&Fc$^+$-C18 和 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18、HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 溶液，每个浓度设定 3 个复孔。培养箱孵育 48 h 后，每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg·mL^{-1}），继续培养 4 h，弃去培养基，于每孔中加入 150 μL DMSO 溶液。用酶标仪在 570 nm 波长条件下测定吸光度，以加入空白培养基的细胞作为对照组，根据公式计算，细胞生存率（%）＝实验组吸光度值 / 对照组吸光度值 ×100%，计算每个浓度下的细胞生存率并绘制生存率曲线；根据联合用药指数（combination index，*CI*）来分析 DOX 与 CUR 的相互作用：$CI = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$（1、2 代表不同药物，$D_1$、$D_2$ 为两者联合使用使生长抑制率达 *x* 时两种药物的浓度；D_{x1}、D_{x2} 为两种药物单独使用使生长抑制率达 *x* 时的药物浓度）。若 $CI < 1$，表明两者具有协同作用；若 $CI = 1$，表明仅有单纯叠加作用；若 $CI > 1$，表明两种药物具有拮抗作用。

2.8 细胞摄取实验

用激光共聚焦和流式细胞术分别定性、定量考察两种细胞对药物的摄取情况。取对数生长期的 4T1 和 LO2 细胞株，以 1×10^5 个 / 孔的密度接种于 6 孔板中，置于 37 ℃培养箱中孵育过夜后，弃去培养基。每孔中分别加入 200 μL 含有 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR、HA-CD@DOX 的 DMEM 高糖培养基，其中 DOX、CUR 质量浓度均为 10 μg·mL^{-1}。此外，为了证实 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 的 CD44 受体介导的细胞摄取，再设置一组实验组，该组在用 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 处理细胞之前，用游离 HA（10 mg·mL^{-1}）预处理细胞 1 h 以阻断 CD44 受体。在培养箱中分别孵育 1、2、4 h 后，加入 0.5 mL 的 PBS 冲洗细胞 2 ～ 3 次以除去未入胞的药物，最后在每孔中加入适量胰蛋白酶和 1 mL PBS 吹打为细胞悬液，于流式细胞仪中定量考察细胞摄取量。同时孵育 1、2、4 h 的 4T1 细胞还用激光共聚焦显微镜观察孵育 1、2、4 h 的 4T1 细胞的细胞摄取情况，并拍照。

2.9 统计学方法

所有数据均用平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，使用 Excel 进行统计学分析，采用 *t* 检验进行显著性分析，当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 HA-CD 的合成及表征

HA-CD 的核磁结果见图 2，^{1}H NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：4.86（s，7H），4.51（s，6H），1.84（s，3H），1.34（p，J = 7.6 Hz，14H）。在 δ1.84 处的核磁峰归属为 HA 上的乙酰基上的甲基氢；δ1.34 ～ 1.5 处的核磁峰归属为己二胺上的氨基氢和碳链氢；在 δ 4.51 ～ 4.86 处则为 β-CD 上的 *α-D-* 吡喃葡萄糖上的羟基氢，表明化合物 HA-CD 制备成功。

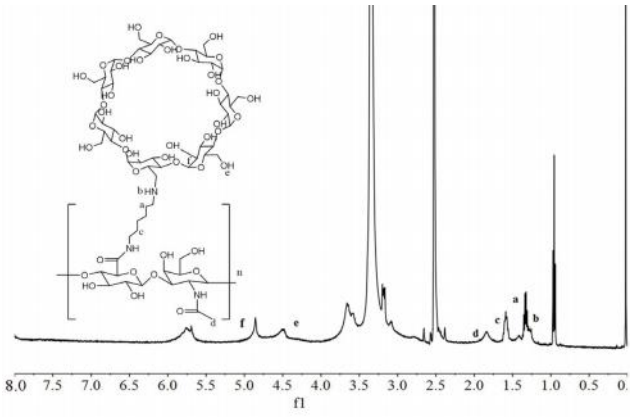


图 2 HA 的 ^{1}H-NMR 图谱（600 MHz，D_2O-d_6）

Fig 2 ^{1}H-NMR spectrum of HA（600 MHz，D_2O-d_6）

3.2 HA-CD@DOX 的表征

HA-CD ＋ DOX、DOX、HA-CD 与 HA-CD@DOX 的红外光谱见图 3。3410 cm^{-1} 处的宽吸收峰归属于 HA 的多羟基特征吸收带（伸缩振动）；1655 cm^{-1} 归属于 C-C 伸缩振动，此峰为环糊精七元环的特征峰。DOX 在 806 cm^{-1} 处的红外峰归因于其苯环上的 γ（C-H）的振动，而该特征峰在 HA-CD@DOX 红外图谱中消失，且 DOX、HA-CD 在 1570 cm^{-1} 的特征峰在包合物的红外图谱中也未显现，物理混合物 HA-CD ＋ DOX 的红外光谱图几乎保留了 HA-CD 和 DOX 的全部特征峰，可认为是两者的混合图谱。HA-CD@DOX 与单纯的物理混合物不同，是形成了包合物；而依据 DOX 的苯环特征峰消失和部分减弱，可推测其与环糊精空腔包合的部位可能是疏水性的蒽环。

3.3 Fc-C18 的结构表征

Fc-C18 的图谱见图 4，^{1}H NMR（400 MHz，Chloroform-*d*）δ：4.83（t，2H），4.41（t，2H），4.22

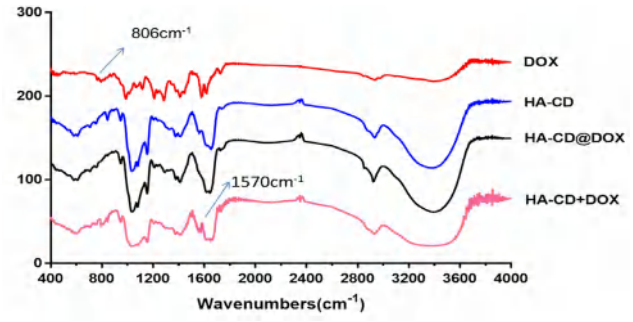


图 3　傅里叶变换红外光谱图

Fig 3　Fourier transform infrared spectra

（s，5H），3.66（t，J = 6.7 Hz，2H），1.45（d，J = 137.1 Hz，30 H），0.90（t，J = 6.6 Hz，3H）。二茂铁甲酸在 δ 12.18 的羧基氢特征峰消失，且同时出现了十八醇的端甲基氢与二茂铁甲酸 δ 4.0 ～ 5.0 处环戊二烯基氢的特征峰，表明化合物成功合成。

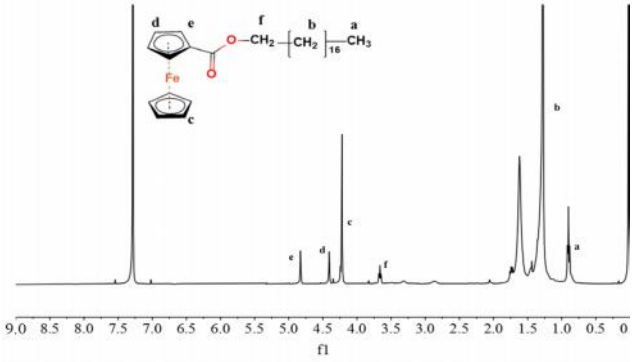


图 4　Fc-C18 的核磁共振氢谱图（400 MHz，Chloroform-d）

Fig 4　^{1}H-NMR hydrogen spectrum of Fc-C18（400 MHz，Chloroform-d）

3.4　Fc^+-C18 胶束的表征

使用芘荧光探针法测量 CMC。在 Fc^+-C18 溶液浓度比较低的时候，I_3/I_1 的值比较稳定，当到达 CMC 时，I_3/I_1 的数值发生了突变，表明 Fc^+-C18 已自组装成胶束，计算交点的溶液浓度，即得 CMC 为 0.02 mg • mL^{-1}。CMC 数值小有利于该胶束在体循环过程中保持稳定，不会过早地将包载于内的药物泄露，从而减少了药物的毒副作用。

3.5　叠层载药胶束的制备与表征

粒径、电位结果如表 1 所示。由于 HA-CD@DOX 的 HA 链上有许多羧基而表现出较低的负电位，Fc^+-C18@CUR 胶束属于阳离子胶束带正电荷，未与 HA-CD@DOX 混合时的电位值为 20 mV。两者混合时，当 c/c = 1∶3 时，电位值较低，为 − 38.00 mV。三种浓度比例的粒径值均在 300 nm 左右，综合考虑 DOX 的用量，选择 c/c = 1∶1 作为双层载药胶束的最终组成浓度比例。HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 水溶液的 TEM 结果如图 5A 所示。叠层载药胶束外形圆整光滑，大小均一，粒径在 150 nm 左右，较之水合粒径偏小；而 20 mmol • L^{-1} GSH 溶液的 HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 的透射电镜图如图 5B 所示。胶束中的二茂铁鎓离子被 GSH 还原，胶束结构被破坏，成不规则絮状物，表明该叠层载药胶束具有 GSH 响应特性。

表 1　HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 电位、粒径（n = 3）

Tab 1　Potential and particle size of HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR（n = 3）

Fc^+-C18@CUR&HA-CD@DOX（c/c）	Zeta 电位 /mV	粒径 /nm	PDI
1∶1	− 32.57±1.49	299.27±15.17	0.171
1∶2	− 33.8±0.59	310.93±11.13	0.214
1∶3	− 38.00±2.76	310.67±19.15	0.259

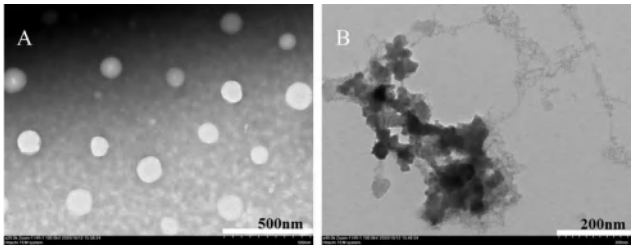


图 5　HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 透射电子显微镜（TEM）图

Fig 5　HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR transmission electron microscopy（TEM）plots

A.HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 水溶液（HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR in aqueous solution）；B.HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 的 20 mmol • L^{-1} GSH 溶液（HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR in 20 mmol • L^{-1} GSH solution）

3.6　叠层载药胶束体外释放

通过透析方法结合 HPLC、荧光分光光度法检测 HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 在不同条件下的 DOX 和 CUR 的释放速率。结果如图 6 所示：DOX 与 CUR 均在 pH 5.5 条件下累积释放量最多，pH 7.4 条件下释放最少，随着 pH 的降低，两种药物的累积释放量增加，pH 的降低有利于叠层载药胶束系统中的酯键水解，从而促进药物释放，表明制剂具有一定的 pH 响应性。由图 6A 可以观察到 DOX 在 48 h 内的最高累积释放量为 40% 左右，推测是由于 DOX 被包载于环糊精空腔中，且外层包覆分子量为 34 000 Da 的 HA 链，在一定程度上减缓了释放，DOX、CUR 在 GSH 浓度为 5 mmol • L^{-1}、20 mmol • L^{-1} 的释放量远大于 GSH 浓度为零的释放量，均表现出较灵敏、快速的同步释放，在 48 h 时释放率高达 80% ～ 90%。

3.7　细胞毒性和细胞摄取 DOX 与 CUR 的抗肿瘤协同作用

以小鼠乳腺癌细胞 4T1 细胞来考察 DOX 与 CUR 的抗肿瘤协同作用，采用 MTT 法研究不同浓度的游离 DOX、游离 CUR 以及两者等浓度混合物

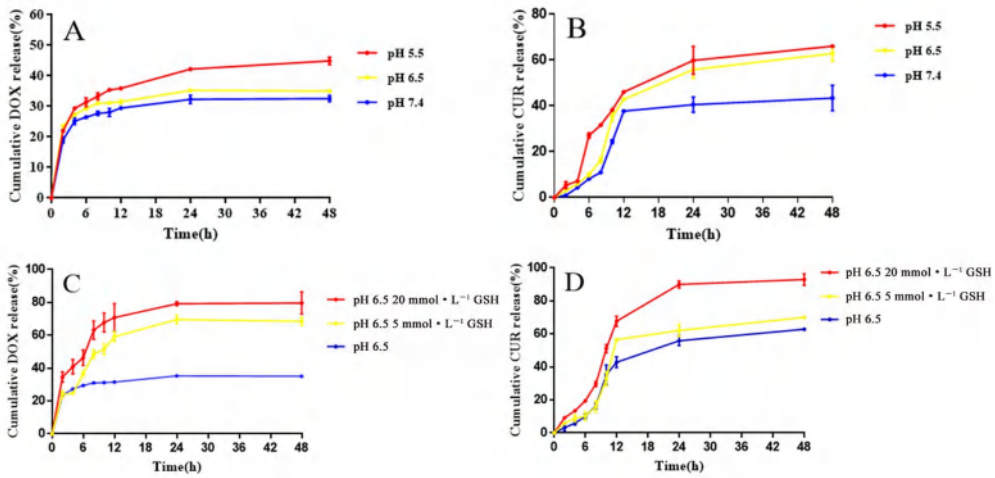


图 6 HA-CD@DOX& Fc^+-C18@CUR 的体外药物释放曲线

Fig 6 In vitro drug release profile of HA-CD@DOX& Fc^+-C18@CUR

A. DOX 在不同 pH 条件下（DOX at different pH conditions）；B. CUR 在不同 pH 条件下（CUR at different pH conditions）；C. DOX 在不同 GSH 浓度条件下（DOX at different GSH concentrations）；D. CUR 在不同 GSH 浓度条件下（CUR at different GSH concentrations）

对肿瘤细胞的细胞毒性，计算各自的 IC_{50} 值，结果如图 7 所示。游离 CUR 的细胞毒性极低，10 μg • mL^{-1} 时的细胞存活率依旧高于 80%。游离 DOX 的细胞毒性随浓度增高而增强。当 DOX、CUR 浓度为 5 μg • mL^{-1} 时，两者混合物的细胞毒性明显高于各自游离物的细胞毒性（$P < 0.01$）。经计算可得游离 DOX 的 IC_{50} 值为 5.438 μg • mL^{-1}，CUR 的 IC_{50} 值为 658 μg • mL^{-1}，而 DOX ＋ CUR 的 IC_{50} 值为 4.305 μg • mL^{-1}。根据 *CI* 来判断两者的相互作用，*CI* ＝ 0.40 ＜ 1，因而证明 DOX 与 CUR 联合使用具有协同作用。

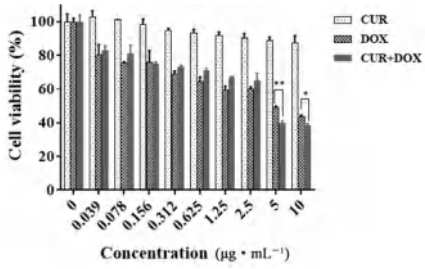


图 7 DOX、CUR 与 DOX ＋ CUR 对 4T1 细胞的细胞毒性

Fig 7 Cytotoxicity of DOX, CUR and DOX ＋ CUR on 4T1 cells

注（Note）：与联合给药组比较，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the co-administration group，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

各个受试药物对 4T1、LO2 细胞的增殖抑制能力结果见图 8，在设定的浓度范围内，各个质量浓度（0.3 ～ 80 μg • mL^{-1}）空载体 HA-CD&Fc^+-C18 与细胞孵育 24 h 后的细胞存活率均在 80% 以上，表明空载体安全性高，生物相容性好。在 0.039 ～ 10 μg • mL^{-1}，DOX ＋ CUR 与 HA-CD@DOX&Fc^+-C18、HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 对 4T1 和 LO2 的细胞毒性均显示出浓度依赖性。

图 8A 显示当 DOX、CUR 的质量浓度在 1.25 μg • mL^{-1} 以上时，HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 组的细胞存活率低于 HA-CD@DOX&Fc^+-C18 组细胞存活率，显示出较高的细胞毒性，体现了联合用药的协同作用；当 DOX 的质量浓度高于 0.625 μg • mL^{-1} 时，HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 组的细胞毒性明显强于 DOX ＋ CUR 的细胞毒性（$P < 0.01$）。此外，DOX ＋ CUR 组的 IC_{50} 值为 4.305 μg • mL^{-1}；制剂组 IC_{50} 值为 2.553 μg • mL^{-1}。这是由于：① HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 具备的 HA 靶向 CD44 受体介导入胞可能比游离 DOX 的自由扩散效率更高；② 肿瘤细胞内浓度较高的 GSH 和微酸环境促进了 CUR、DOX 的释放，实现了 DOX 与 CUR 的抗肿瘤协同作用，因而 HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 组对肿瘤细胞有更显著的杀伤力和抑制作用。

图 8B 显示当 DOX 的质量浓度高于 0.312 μg • mL^{-1} 时，DOX ＋ CUR 的细胞毒性强于制剂组（$P < 0.05$）；且在给定 DOX 浓度范围内，HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 组的细胞存活率均高于 DOX ＋ CUR 组；且与 4T1 细胞相比，HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 组对 LO2 细胞的毒性更低。这是由于 LO2 作为正常细胞，其表面 CD44 受体表达量低，因而摄取率不如游离 DOX 的自由扩散效率高。同时，正常细胞内 GSH 浓度极低，致使 CUR 的释放量也远不如肿瘤细胞内的释放量，对细胞的抑制作用弱，因此 LO2 细胞的细胞存活率高于 4T1 细胞。

体外细胞学摄取结果如图 9 所示。图 9A 为 HA-CD@DOX&Fc^+-C18@CUR 与 4T1 细胞共孵育 1、2、4 h 后的结果。可以看出，随着共孵育时间的延长，细胞内的 DOX 的荧光强度明显增强，

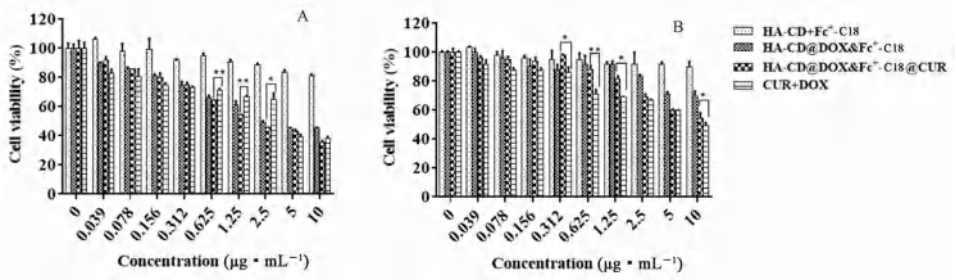


图 8　CUR ＋ DOX、HA-CD&Fc$^+$-C18、HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR、HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18 对 4T1（A）和 LO2（B）的细胞毒性

Fig 8　Cytotoxicity of CUR ＋ DOX，HA-CD&Fc$^+$-C18，HA-CD@DOX& Fc$^+$-C18@CUR，and HA-CD@DOX& Fc$^+$-C18 on 4T1 cells（A）and LO2 cells（B）

注（Note）：　与 HA-CD@DOX& Fc$^+$-C18@CUR 比　较，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the HA-CD@DOX& Fc$^+$-C18@CUR，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

即细胞对制剂的摄取具有时间依赖性。而图 9B 则为 HA-CD@DOX 与 4T1 细胞共孵育 1、2、4 h 后的结果。孵育时间相同，HA-CD@DOX 组别内的荧光强度明显弱于 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR，这是由于肿瘤微环境内 GSH 浓度高于正常细胞，将二茂铁基团转化为疏水性基团，促进环糊精空腔内 DOX 的释放。因而相同时间内，HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 的荧光强度更强。

而为了验证 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 是由 CD44 受体介导入胞的这一摄取行为，将细胞与游离 HA 预处理 1 h 以阻断 CD44 受体，摄取结果见图 10C，与图 10A 相比较，经过游离 HA 预处理组的荧光强度显著降低，说明 HA 在细胞摄取中的竞争作用，这也意味着 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 是通过 CD44 受体介导被细胞摄取。

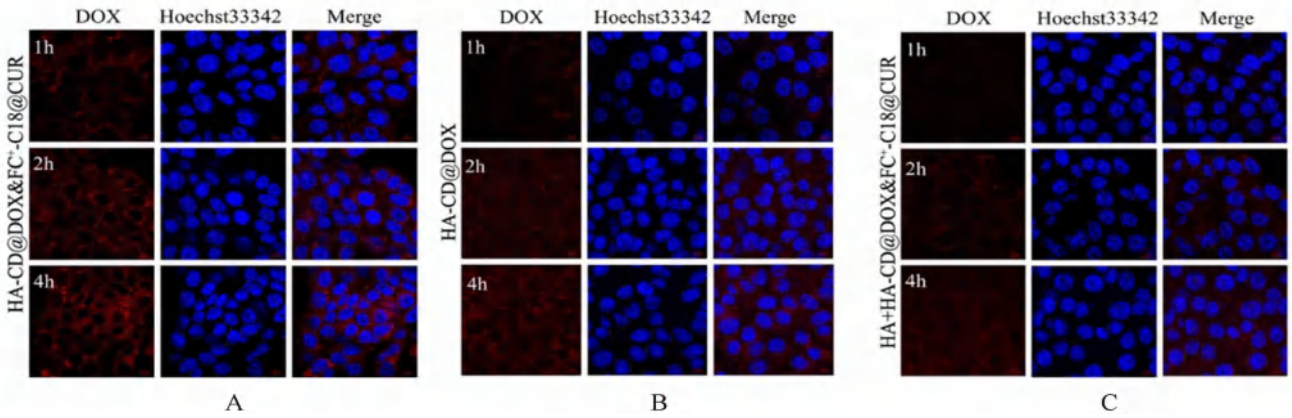


图 9　体外细胞摄取激光共聚焦图

Fig 9　In vitro cell uptake laser confocal map

A. HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 与 4T1 细胞共孵育（HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR incubated with 4T1 cells）；B. HA-CD@DOX 与 4T1 细胞共孵育（HA-CD@DOX incubated with 4T1 cells）；C. HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 与游离 HA 预处理组与 4T1 细胞共孵育（HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR incubated with free HA pretreatment group with 4T1 cells）

采用流式细胞术对细胞摄取结果进行定量分析，结果与激光共聚焦定性分析结果相吻合（见图 10）。4T1 细胞对制剂、HA-CD@DOX 的摄取均具有时间依赖性，且 HA-CD@DOX 中 DOX 的释放趋势较之制剂更缓慢，且差异具有统计学意义（$P < 0.01$），进一步证明了内层胶束经 GSH 还原后的促释作用；经 HA 处理过的细胞内的荧光强度低于未经处理的制剂组，1 h 的荧光强度差异最大，随着孵育时间延长，摄取量差异减小，这可能是因为 HA 的阻断作用随时间延长而减弱。

LO2 细胞对 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 摄取情况见图 11。孵育 1、2、4 h 细胞内的荧光强度远远低于 4T1 细胞，且随着孵育时间的延长，LO2 细胞内的荧光强度也并未有显著变化。这是因为制剂是由 CD44 介导的细胞摄取，而作为正常细胞，其表面的 CD44 受体显著低于肿瘤细胞，因而制剂的摄取量大大降低，且制剂内的 DOX 快速释放又依赖于肿瘤细胞内的高 GSH 和低 pH 环境，因而 DOX 的释放量也显著降低。

综合细胞摄取的定性和定量分析结论，证明了 HA-CD@DOX&Fc$^+$-C18@CUR 可以主动靶向至肿瘤细胞并在肿瘤细胞特殊微环境条件下实现药物的定点快速释放。

4　结论

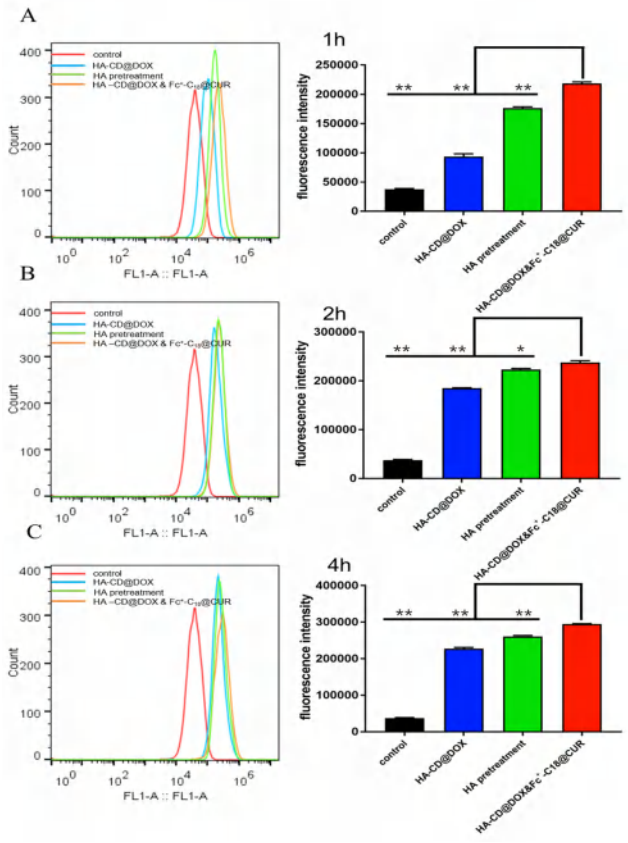


图 10 流式细胞仪测定结果

Fig 10 Flow cytometry assay

A ～ C. 分别表示 4T1 细胞与 HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR、HA-CD@DOX、HA 预处理组共孵育 1、2、4 h（A ～ C. represents 4T1 cells were incubated with HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR，HA-CD@DOX，and HA pretreatment group for 1，2，4 h）

注（Note）：与 HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR 比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

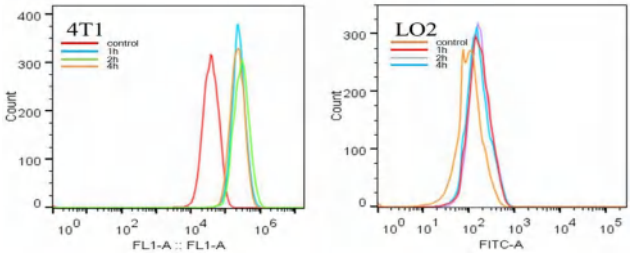


图 11 4T1 细胞、LO2 细胞与 HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR 共孵育 1、2、4 h 的测定结果

Fig 11 4T1 cells and LO2 cells incubated with HA-CD@DOX&Fc^{+}-C18@CUR for 1，2 and 4 h

本研究基于包合物与自组装胶束作为纳米递送系统实现了对多个药物的联合递送，且在到达酸性、高还原性条件的肿瘤时，HA-CD&Fc^{+}-C18 能够通过响应性解体，实现同步递送和高效释放 DOX 和 CUR，实现了对肿瘤细胞的联合治疗。

参考文献

[1] 邹蔓姝，周莉莉，乔勇，等 . 抗肿瘤药与抗多药耐药小核酸共递送纳米给药系统的研究进展 [J]. 中国药学杂志，2018，53（19）：6-11.

[2] Mignani S，Bryszewska M，Klajnert-Maculewicz B，et al. Advances in combination therapies based on nanoparticles for efficacious cancer treatment：an analytical report [J]. Biomacromolecules，2015，16（1）：1-27.

[3] Parhi P，Mohanty C，Sahoo SK. Nanotechnology-based combinational drug delivery：an emerging approach for cancer therapy [J]. Drug Discov Today，2012，17（17-18）：1044-1052.

[4] Allison SD. Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly（lactic-co-glycolic）acid microparticle drug delivery systems [J]. J Pharm Sci，2008，97（6）：2022-2035.

[5] Yeo Y，Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems [J]. Arch Pharm Res，2004，27（1）：1-12.

[6] Bezemer JM，Radersma R，Grijpma DW，et al. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic-multiblock copolymers：2. Modulation of release rate [J]. J Controll Release，2000，67（2-3）：233-248.

[7] Berkland C，Kim KK，Pack DW. PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors [J]. Pharm Res，2003，20（7）：1055-1062.

[8] Berkland C，Kipper MJ，Narasimhan B，et al. Microsphere size，precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres [J]. J Controll Release，2004，94（1）：129-141.

[9] Lee WL，Loo SCJ. Revolutionizing drug delivery through biodegradable multilayered particles [J]. J Drug Target，2012，20（8）：633-647.

[10] Fabrication and drug release study of double-layered microparticles of various sizes [J]. J Pharm，2012，101（8）：2787-2797.

[11] Lee WL，Widjaja E，Loo SCJ. Designing drug-loaded multi-layered polymeric microparticles [J]. J Mater Sci Mater Med，2011，23（1）：81-88.

[12] Wei X，Senanayake TH，Warren G，et al. Hyaluronic acid-based nanogel-drug conjugates with enhanced anticancer activity designed for the targeting of CD44-positive and drug-resistant tumors [J]. Bioconjug Chem，2013，24（4）：658-668.

[13] Mknüpfer M，Poppenborg H，Hotfilder M，et al. CD44 expression and hyaluronic acid binding of malignant glioma cells [J]. Clin Exp Metastas，1999，17（1）：71-76.

[14] Liu L，Cao F，Liu X，et al. Hyaluronic acid-modified cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticles as a nanovaccine induce robust humoral and cellular immune responses [J]. Acs Appl Mater Interfaces，2016，8（19）：11969-79.

[15] Kuppusamy P，Li H，Ilangovan G，et al. Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels [J]. Cancer Res，2002，62（1）：307-312.

[16] Ding C，Li Z. A review of drug release mechanisms from nanocarriersystems [J]. Mat Sci Eng C，2017，76：1440-1453.
[17] Tomatsu I，Hashidzume A，Harada A. Redox-responsive hydrogel system using the molecular recognition of β-cyclodextrin [J]. Macromol Rapid Comm，2006，27（4）：238-241.
[18] Matsue T，Evans DH，Osa T，et al. Electron-transfer reactions associated with host-guest complexation. Oxidation of ferrocenecarboxylic acid in the presence of beta-cyclodextrin [J]. J Am Chem Soc，1985，107（12）：3411-3417.
[19] Pravata L，Braud C，Boustta M，et al. New amphiphilic lactic acid oligomer-hyaluronan conjugates：synthesis and physicochemical characterization [J]. Biomacromolecules，2008，9（1）：340.
[20] 袁明，袁明，赵协慧，等 . HPLC 法测定酸脂清胶囊中姜黄素的含量 [J]. 陕西中医，2007，28（5）：598-599.
（收稿日期：2022-11-04；修回日期：2022-12-24）

电子束辐照对藏药材力嘎都质量的影响

余杨健[1，2，3]，谢和兵[1，2，3，4*]，尼玛次仁[3，4]，白玛旦增[3，4]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥　230013；2. 南通市海门长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；3. 江苏神猴医药研究有限公司，江苏　南通　226133；4. 西藏神猴药业有限责任公司，西藏　日喀则　857000）

摘要：目的　考察电子束辐照对藏药材力嘎都质量的影响。**方法**　选择不同辐照剂量对力嘎都药材粉末进行辐照处理，比较辐照前后力嘎都的粉末性状、显微特征、岩白菜素和熊果苷薄层色谱图、岩白菜素含量和液相色谱图，以及细菌总数、霉菌和酵母菌总数和大肠菌群的变化情况。**结果**　辐照前后力嘎都粉末性状、显微特征、薄层色谱图、岩白菜素含量均未见明显变化，细菌菌落数、霉菌和酵母菌菌落总数显著降低（$P < 0.05$），当辐照剂量达到 10 kGy 时，力嘎都药材粉末微生物水平符合 2020 年版《中国药典》规定。**结论**　电子束辐照对力嘎都主要活性成分无显著影响，并能在 10 kGy 时达到良好的灭菌效果，电子束辐照适用于力嘎都药材的灭菌。

关键词：力嘎都；电子加速器；辐照灭菌；岩白菜素
中图分类号：R282.71，R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1841-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.024

Effect of electron beam irradiation on the quality of Tibetan medicine Ligadu

YU Yang-jian[1, 2, 3], XIE He-bing[1, 2, 3, 4*], Ni-Ma-Ci-Ren[3, 4], Bai-Ma-Dan-Zeng[3, 4] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei*　230013; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong*　*Jiangsu*　226133; 3. *Jiangsu Shenhou Pharmaceutical Research Co.*, *Ltd*, *Nantong Jiangsu*　226133; 4. *Tibet Shenhou Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Xigaze*　*Tibet*　857000)

Abstract: Objective　To determine the effect of electron beam irradiation on the quality of Tibetan medicine Ligadu. **Methods**　Different irradiation doses were selected to irradiate the medicinal powder of Ligadu. The properties, microscopic characteristics, thin layer chromatograms of bergenin and arbutin, bergenin content and liquid chromatograms of the medicinal powder of Ligadu before and after the irradiation were compared, as the changes in the total number of bacteria, mold, yeast and coliform bacteria were recorded. **Results**　There was no significant change in the properties,

基金项目：西藏自治区科技厅中央引导地方科技发展项目（No. XZ202202YD0020C）。
作者简介：余杨健，女，在读硕士研究生，主要从事中药药剂学研究，email：1197786037@qq.com　*通信作者：谢和兵，男，硕士研究生导师，主要从事高原医学、传统藏药产业化开发研究，email：76445044@qq.com

microscopic characteristics, thin-layer chromatography and bergenin content of Ligadu powder before and after the irradiation. The number of bacterial colonies and the total number of mold yeasts were significantly decreased ($P < 0.05$). When the irradiation dose reached 10 kGy, the microbial level of Ligadu powder met the requirements of the Chinese Pharmacopoeia 2020. **Conclusion** Electron beam irradiation has no significant effect on the main active components of Ligadu, and good sterilization effect is obtained at 10 kGy. Electron beam irradiation helps sterilize Ligadu medicinal materials.

Key words: Ligadu; electron accelerator; irradiation sterilization; bergenin

藏药材力嘎都为景天科植物狭叶红景天 *Rhodiola kirilowii*（Regel）Maxim. 或虎耳草科植物岩白菜 *Bergenia purpurascens*（Hook.f. et Thoms.）Engl. 的干燥根及根茎，多分布于青海、西藏、四川、甘肃等地[1]。力嘎都味苦性寒，具有清热解疫、祛瘀消肿的功效[2]，是传统藏成药制剂中的常用药材，清肺止咳丸、二十味肉豆蔻丸、八味檀香丸等藏药制剂中均含有力嘎都。力嘎都多取根部以原生药粉直接入药，其根茎部位由于长时间处于地下，容易滋生大量虫卵、杂质、微生物，且加工炮制时未经过高温蒸煮等过程，微生物超标现象时有发生[3-5]。岩白菜素是力嘎都药材的主要活性成分，其结构中含有易水解和氧化的内酯环和酚羟基，在高温高湿条件下不稳定[6]，目前藏药生产企业常用的湿热、干热等灭菌方式均会导致其活性成分岩白菜素的降解，从而影响药效，并不适合用于力嘎都药材以及含力嘎都生药粉的藏成药的灭菌。电子束辐照是一种新兴的冷灭菌技术，本文以力嘎都药材为研究对象，进行不同强度的电子束辐照处理，考察电子加速器辐照对力嘎都药材主要活性成分及灭菌效果的影响，为力嘎都药材以及含力嘎都药材的藏药制剂产品的辐照灭菌提供参考，同时也为含挥发性活性成分以及热不稳定成分的藏药材、藏成药的灭菌工艺研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

20B 高效万能粉碎机（常州市强迪干燥设备有限公司）；Essentia LC-16 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；XSR205DU/AC 十万分之一天平（梅特勒托利多科技有限公司）；数显电热套（杭州振和科学仪器有限公司）；WMS-1037 生物光学显微镜（上海无陌光学仪器有限公司）；UC-250DE 超声清洗仪、DHG-9030A 电热鼓风干燥箱、SHZ-A 双数显水浴恒温振荡器（上海精其仪器有限公司）。

1.2 试药

力嘎都药材由西藏神猴药业有限责任公司提供，经江苏神猴医药研究有限公司鉴定为虎耳草科植物岩白菜 *Bergenia purpurascens*（Hook.f. et Thoms.）Engl. 的干燥根及根茎；对照品岩白菜素（批号：111532-202005，纯度：94.4%）、熊果苷（批号：111951-201301，纯度：99.7%）（中国食品药品检定研究院）；甲醇为色谱纯（安徽时联特种溶剂股份有限公司，批号：6508CU13）；甲酸、丙三醇、乙酸、乙酸乙酯、丙酮、三氯化铁、铁氰化钾（分析纯，国药集团化学试剂有限公司，批号分别为 20211026、20210514、20210906、20210514、20211230、20210511、20210521）；三氯甲烷（分析纯，上海泰坦科技股份有限公司，批号：P2081607）。

2 方法与结果

2.1 药材处理及辐照方法的选择

将力嘎都药材粉碎成粗粉，过二号筛，将粉末分装于 PET 样品瓶中，每个剂量组 4 瓶，共 24 瓶，每瓶 15 g。所有试验用辐照样品均由中广核戈瑞科技有限公司采用电子加速器辐照处理，辐照剂量分别为 0、2、4、6、8、10 kGy。

2.2 性状

对辐照前后力嘎都药材粉末进行性状检测，结果见图 1。辐照前后力嘎都粉末外观、色泽、气味均未发生明显变化，说明电子束辐照对力嘎都粉末性状均无明显影响。

2.3 显微鉴别

参照 2020 年版《中国药典》四部通则 2001 显微鉴别法中粉末制片法进行相关操作，观察辐照前后力嘎都粉末特征，结果见图 2。力嘎都粉末辐照前后视野均可见草酸钙簇晶分布，淀粉粒呈椭圆形或梨形，两端稍尖，层纹和脐点不明显。导管多为网状，表皮细胞呈红棕色，表面观呈多角形或类长方形，木栓细胞表面观呈多角形。说明电子束辐照对力嘎都粉末显微特征无明显影响。

2.4 薄层鉴别

分别取 0、2、4、6、8、10 kGy 辐照剂量组力嘎都药材粉末各 0.2 g 置于具塞锥形瓶中，加甲

图 1　力嘎都药材粉末辐照前后性状图

Fig 1　Characteristics of Ligadu powder before and after the irradiation

醇 20 mL，密塞，超声处理 40 min，放冷，用玻璃漏斗过滤，取续滤液作为力嘎都供试品溶液。另取岩白菜素、熊果苷对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的对照品溶液。参照 2020 年版《中国药典》四部通则 0502 薄层色谱法，吸取混合对照品溶液和各供试品溶液 5 μL，分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上，以三氯甲烷 - 乙酸乙酯 - 甲醇（4∶4∶1.5）为展开剂，展开 2 次，取出，晾干，置紫外光灯（254 nm）下检视。供试品色谱中，在与岩白菜素对照品色谱相应的位置上，

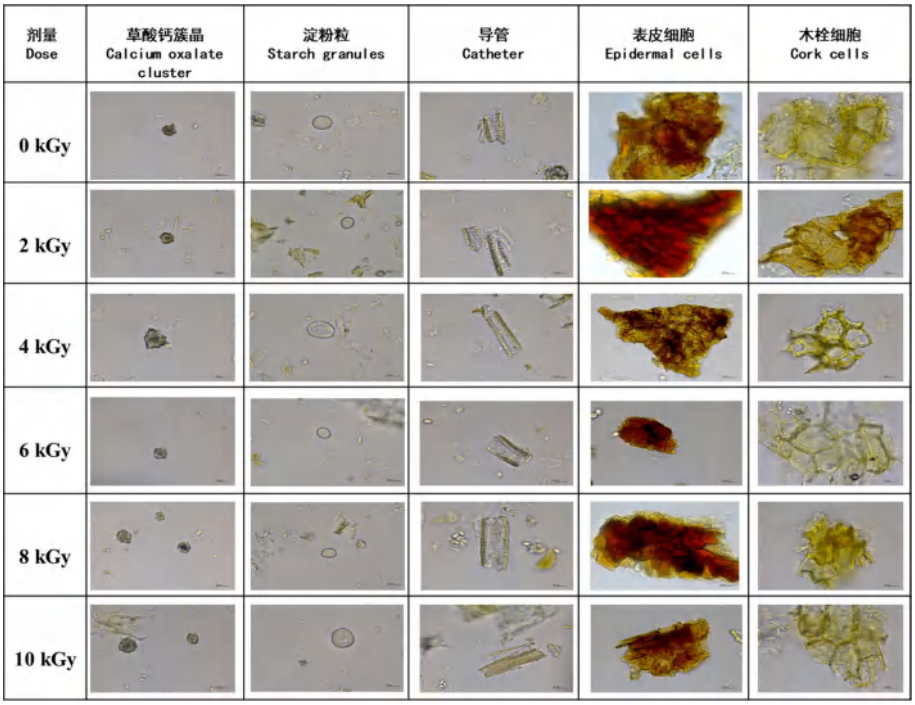


图 2　力嘎都药材粉末辐照前后显微特征图（×400）

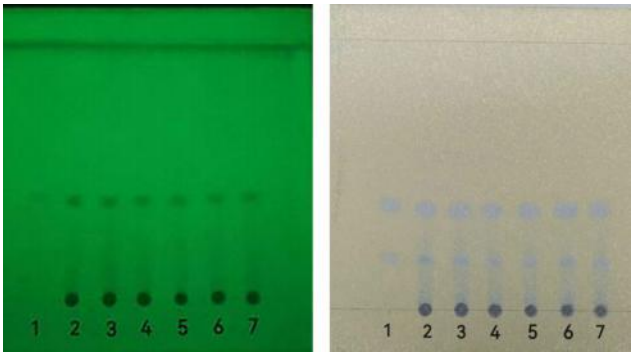
Fig 2　Microscopic characteristics of Ligadu powder before and after irradiation（×400）

显相同颜色的斑点；再喷以 2% 三氯化铁溶液 -1% 铁氰化钾溶液（1∶1）的混合溶液，供试品色谱中，在与岩白菜素、熊果苷对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。结果见图 3。

2.5　含量测定

2.5.1　色谱条件　色谱柱：Platisil-C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水（20∶80，*V/V*）；流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；检测波长：275 nm；进样量：10 μL。理论塔板数按岩白菜素峰计算应不低于 4500。

2.5.2　对照品溶液的制备　精密称取岩白菜素对照品 10.15 mg 于 10 mL 量瓶中，加 80% 甲醇定容，即得岩白菜素对照品母液。移取 7 mL 对照品母液于 20 mL 量瓶中，用 80% 甲醇定容，摇匀，微孔滤膜滤过，取续滤液，即得质量浓度为 0.34 mg·mL^{-1} 的岩白菜素对照品溶液。



紫外光（254 nm）　　可见光

图 3　力嘎都粉末辐照前后薄层色谱图

Fig 3　Thin layer chromatogram of Ligadu powder before and after the irradiation

注：1. 混合对照品溶液；2 ～ 7. 供试品溶液（辐照剂量依次为 0、2、4、6、8、10 kGy）。

Note：1. mixed reference solution；2 ～ 7. sample solution（irradiation dose is 0，2，4，6，8，10 kGy）.

2.5.3 力嘎都粉末供试品溶液的制备 取力嘎都粉末约 0.2 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 80% 甲醇适量，超声处理（功率 100 W，频率 25 kHz）40 min，放冷，加 80% 甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得力嘎都供试品溶液。

2.5.4 辐照前后力嘎都样品测定 取辐照前后（10 kGy）力嘎都粉末按照“2.5.1”项下色谱条件进样测定，高效液相色谱图见图 4，可直观地看出辐照前后目标峰图谱无明显改变。采用 SPSS 26.0 分析软件进行统计学分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。辐照前后含量数据比较采用单因素方差分析中的事后多重比较，方差齐时采用 LSD-*t* 和 Bonferroni 检验；方差不齐时采用 Tamhane’s T2 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果见表 1。由表可知，电子加速器辐照对力嘎都粉末中岩白菜素含量无显著影响。

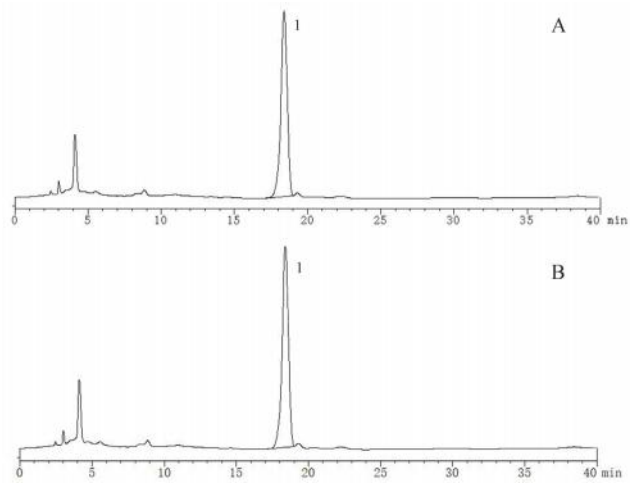


图 4 辐照前（A）后（B）力嘎都粉末高效液相色谱图

Fig 4 HPLC of Ligadu powder before (A) and after (B) the irradiation

1. 岩白菜素（bergenin）

表 1 不同辐照剂量对力嘎都中岩白菜素含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

Tab 1 Effect of different radiation doses on bergenin content in Ligadu（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

辐照剂量 /kGy	岩白菜素 /%
0	5.41±0.12
2	5.39±0.11
4	5.37±0.14
6	5.43±0.05
8	5.39±0.03
10	5.30±0.04

2.6 微生物限度测定

参照 2020 年版《中国药典》四部通则 1105 微生物计数法、1106 控制菌检查法和 1107 非无菌药品微生物限度标准，对辐照前后力嘎都粉末细菌菌落总数、霉菌和酵母菌总数及大肠菌群进行检查，结果见表 2。可知经 10 kGy 剂量的辐照，力嘎都粉末微生物水平符合 2020 年版《中国药典》规定。

表 2 不同辐照剂量对力嘎都微生物限度的影响（$n = 2$）

Tab 2 Effect of different irradiation doses on microbial limit of Ligadu（$n = 2$）

辐照剂量 /kGy	细菌		霉菌和酵母菌		大肠菌群	
	活菌数 /（CFU·g^{-1}）	存活率 /%	活菌数 /（CFU·g^{-1}）	存活率 /%	活菌数 /（CFU·g^{-1}）	存活率 /%
0	1.1×10^{5}	100.00	3.2×10^{4}	100.00	0	0
2	$8.8\times10^{4*}$	80.16	$8.3\times10^{3*}$	26.49	0	0
4	$6.6\times10^{4*}$	60.33	$1.4\times10^{3*}$	4.52	0	0
6	$4.5\times10^{4*}$	40.49	$1.5\times10^{2*}$	0	0	0
8	$2.3\times10^{4*}$	20.62	0^{*}	0	0	0
10	$8.5\times10^{2*}$	0.77	0^{*}	0	0	0

注：与 0 kGy 比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with the 0 kGy，$^{*}P < 0.05$.

3 讨论

目前中药常用的灭菌方式有过热蒸汽灭菌、干热灭菌、微波灭菌等“热灭菌”方式，但这些方法常会导致生药药粉色泽变深、有效成分降解、挥发性成分逸散等问题，此外这些热灭菌设备和设施均需企业自行建设，采购、安装、运行维护的成本较高。电子加速器辐照灭菌是利用电子加速器产生的高能电子束照射物质达到灭菌目的，属于“冷灭菌”技术，其穿透性强、灭菌时间短、安全环保，适用于含生药材粉以及热不稳定性成分、挥发性成分较多的中药的灭菌。电子加速辐照与传统的 ^{60}Co 辐照相比，具有辐照束流定向、能量利用充分、效率高且不产生放射性废物、建设运行成本低等优点[7-9]。而且电子加速辐照绝大多数是由第三方公司投资建设、运营，面向医药、医疗器械等目标企业提供辐照服务，目标企业采用电子加速辐照的成本主要来源于运输和辐照加工费，与原先自行采购、运行热灭菌设备相比，成本显著下降、灭菌产品的质量保障水平得到提高。随着电子加速器制造技术的不断进步，电子

加速辐照在中药、食品灭菌领域广泛使用，促进了相关产业的高质量发展，但对传统含有藏药材生药粉的藏成药的辐照灭菌研究较少。

中药辐照灭菌有两种处置方式，一种是将中药材直接进行辐照后再在洁净环境下粉碎成药粉，一种是对粉碎后的药粉进行灭菌处理[10]。由于藏药材多以原生药粉入药，为了避免植物表皮以及内部结构对辐照电子束穿透性的影响，避免在后续的粉碎、加工过程中过多地引入微生物，本试验以力嘎都粉末形式直接进行辐照灭菌处理。

力嘎都具有多个基原，可分别来源于景天科植物狭叶红景天或虎耳草科植物岩白菜的干燥根及根茎。根据西藏地区用药习惯，本试验使用的力嘎都来源于虎耳草科植物岩白菜的干燥根茎。岩白菜的主要有效成分有岩白菜素、熊果苷、儿茶素、没食子酸等，其中岩白菜素多富集于岩白菜的根茎，具有抗炎、镇咳、抗肿瘤等疗效[11-13]，2020 年版《中国药典》收载的岩白菜药材的质量标准中就将岩白菜素作为有效成分。熊果苷为岩白菜的主要次生代谢产物，具有抗菌消炎的功效[14-15]。因此本试验选取岩白菜素和熊果苷作为指标成分，对辐照前后力嘎都粉末进行岩白菜素和熊果苷薄层定性鉴别以及岩白菜素含量测定分析。结果辐照前后力嘎都药材粉末性状、显微特征、岩白菜素和熊果苷薄层色谱图、岩白菜素含量均未见明显变化，当辐照剂量达到 10 kGy 时，力嘎都粉末细菌总数、霉菌和酵母菌总数及大肠菌群符合药典规定。

本试验为电子束辐照用于藏药材力嘎都的适用性研究，可为藏药材力嘎都以及含力嘎都药材的藏成药的辐照灭菌提供参考，同时也为含有藏药材生药粉的藏成药的灭菌提供的新的思路。

参考文献

[1] 青海省食品药品监督管理局 . 青海省藏药炮制规范 [S]. 西宁：青海民族出版社，2010：45.

[2] 西藏自治区食品药品监督管理局 . 西藏自治区藏药材标准（第一册）[S]. 西藏：西藏人民出版社，2012：68.

[3] 石梦菲，德吉措姆，普巴扎西，等 . 藏药七十味珍珠丸微生物限度检查法验证 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（5）：2946-2948.

[4] 旺多，赵永强，赖先荣 . 藏药固体制剂生产存在的共性技术难题与对策 [J]. 中国药房，2013，24（35）：3350-3352.

[5] 徐雪梅，杨金草，吴云峰，等 . 对藏药制剂微生物限度检查的探讨 [J]. 中国民族医药杂志，2003，9（1）：24-25.

[6] 孙海林，李文军，刘海周，等 . 初均速法预测岩白菜醇提液的稳定性研究 [J]. 云南中医中药杂志，2013，34（2）：47-48.

[7] 王钢，王丹，何毅，等 . 麦冬、大黄饮片电子束辐照灭菌工艺研究 [J]. 核农学报，2022，36（8）：1579-1588.

[8] 徐远芳，彭玲，李鹏辉，等 . 基于谱效分析评价电子束辐照灭菌对山银花药材质量的影响 [J]. 核农学报，2022，36（4）：745-753.

[9] 许丽丽，徐兴燕，汪冰，等 . 电子束辐照灭菌对蓬莪术化学成分的影响 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（12）：7302-7305.

[10] 张乐佳，李黎明，宋军，等 . ^{60}Co-γ 射线辐照灭菌对鸡内金生药粉质量影响的研究 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1546-1550.

[11] 任慧，崔小敏，胡静，等 . 秦岭岩白菜根茎化学成分的 UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（9）：118-128.

[12] 陈伶俐，易少凌 . 岩白菜素提取工艺及生物活性的研究概况 [J]. 广东化工，2020，47（13）：93-95.

[13] 张军，田月晖 . 岩白菜素对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡及 NF-κB 信号通路的影响 [J]. 现代医学，2022，50（4）：452-459.

[14] 李卫鸿，韩芸，师成玲，等 . 熊果苷通过调控巨噬细胞 TLR4/NF-κB 通路抑制结核分枝杆菌活性的研究 [J]. 临床和实验医学杂志，2021，20（18）：1940-1944.

[15] 刘晓婷，王鑫璇 . 熊果苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 食品与发酵工业，2022，48（2）：309-316.

（收稿日期：2022-10-17；修回日期：2022-11-25）

综述

“变价”纳米递送系统在肿瘤治疗中的研究进展

金哲妮[1]，程苇钇[1]，何莉[1]，包丹丹[2*]，朴寄纲[1*]（1. 浙江中医药大学药学院，杭州 310053；2. 浙江中医药大学附属第一医院，杭州 310006）

摘要：肿瘤严重危害人类身体健康，传统化疗等手段对正常细胞的生物相容性和高毒副作用等问题不容忽视，亟需寻找更为高效的治疗策略。金属及类金属基纳米材料因其具有良好的催化能力、理化特性已在肿瘤诊断和治疗中展现出良好的应用潜力。通过“变价”特性设计的纳米递送系统在实现药物靶向递送，提高抗肿瘤效果，降低毒副作用等方面展现出巨大优势。本文综述了各类“变价”纳米递送系统在肿瘤治疗中的进展和应用，以期为金属及类金属基纳米材料用于肿瘤治疗的进一步开发研究提供参考。

关键词：纳米递送系统；毒副作用；多价态元素；肿瘤治疗
中图分类号：R943 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1846-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.025

Research progress in valence-variable nano-delivery system in tumor treatment

JIN Zhe-ni[1], CHENG Wei-yi[1], HE Li[1], BAO Dan-dan[2*], PIAO Ji-gang[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Zhejiang University of Chinese Medical*, *Hangzhou* 310053; 2. *The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University*, *Hangzhou* 310006)

Abstract: Tumors are endangering human health. Biocompatibility problems and high toxic side effects on normal cells in traditional chemotherapy treatment cannot be ignored. It is urgent to find more efficient treatment strategies. Metal and metalloid nano-materials have shown potential in tumor diagnosis and treatment due to their good catalytic and physicochemical properties. Nano-delivery systems designed with valence-variable properties have shown obvious advantages of targeted drug delivery, improved anti-tumor effects, and reduced toxic effects. This paper reviewed the progress in various types of valence-variable nano-delivery systems in tumor therapy, to provide a reference for development of metal and metalloid-based nano-materials for tumor therapy.

Key words: nano-delivery system; toxic side effect; multivalent element; tumor treatment

肿瘤是目前危害人类生命健康最严重的恶性疾病之一，其发病率和死亡率逐年升高[1]。肿瘤纳米疗法，在改善抗肿瘤药物理化性质，提高抗肿瘤疗效等方面展现出极大的潜力和应用价值[2-3]。通过对纳米药物载体功能化可改善联合用药疗效，提高药物选择性、安全性以及降低不良反应等[4-5]。

纳米粒具有良好的催化能力、导电性以及光学特性已在生物检测、细胞成像、肿瘤治疗等生物医学领域应用广泛[6-7]。金、银、铁和 / 或氧化铁、锌、钛、氧化铈、镍、铜、镁、钡、钙和铋基等纳米粒已被报道可用于肿瘤治疗[8-10]，此外，非金属砷因具有与金属相似的价态毒性关联性，

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82104405）；浙江省自然科学基金项目（No.LY23H300002）；浙江省中医药优秀青年人才基金项目（No.2021ZQ036）。

作者简介：金哲妮，女，email：1226752739@qq.com *通信作者：包丹丹，女，主治医师，主要从事新型给药系统及靶向制剂的研究，email：baodandan1990@163.com；朴寄纲，男，副教授，主要从事新型给药系统及靶向制剂的研究，email：jgpiao@zcmu.edu.cn

也可用于肿瘤治疗。一方面，利用金属及类金属基纳米材料构建的递送系统可与 DNA、溶酶体、酶以及核糖体等相互作用，产生细胞膜通透性改变、蛋白质失活、基因突变或氧化应激等作用而导致肿瘤细胞死亡；另一方面，纳米粒可起到控制药物释放、靶向递送以及缓控释等作用 [11]，但仍存在对正常组织的不利影响，如毒副作用和炎症反应。研究证明，静脉注射后仅有 0.001% 的金属及类金属基纳米粒可在肿瘤细胞中被检测到，而高达 90% 的纳米粒则会被内皮网状系统捕获 [12]，引发基质金属蛋白酶的激活导致炎症的发生 [13]。以化疗药物化合价变化为基础构建的纳米递送系统近年来逐渐进入人们的视线。这类纳米递送系统在体外时具有较低的毒副作用或良好的生物安全性，进入体内后能够根据肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）中的特点转化并释放具有高毒性和高抗肿瘤活性的药物。与传统纳米递送相比，该纳米递送系统具有多种优势：① 基于不同价态下生物活性差异，可进行特异性肿瘤治疗并合理调控毒性，减少不良反应；② 在治疗后利用 TME 中过量小分子实现化合价变价再生以循环治疗；③ 合理利用 TME 的特异性为肿瘤治疗提供有效靶点；④ 通过化合价自由转化改善 TME。

本综述研究并总结了用于肿瘤治疗的“变价”纳米递送系统（见表 1），分别从变价在肿瘤治疗中的优势、机制及影响等重点介绍基于化合价变化所设计的纳米递药系统及其应用，并讨论其中存在的机遇和挑战。

表 1　应用于肿瘤治疗的“变价”纳米递送系统概况

Tab 1　“Valence-variable” nano-delivery systems for tumor treatment

构建原理	元素	原位过渡价态
价态与毒性关联性	砷（As）	As^0-As^{3+}
		As^{5+}-As^{3+}
	钼（Mo）	$Mo^{5+/6+}$-$Mo^{6+/5+}$
		$Mo^{4+/6+}$-$Mo^{6+/4+}$
药物控释	铁（Fe）	Fe^{3+}-Fe^{2+}
	锰（Mn）	Mn^{3+}-Mn^{2+}
氧化还原内稳态	钴（Co）	Co^{3+}-Co^{2+}
	铜（Cu）	$Cu^{+/2+}$-Cu^{+}
	钒（V）	$V^{4+/5+}$-$V^{5+/4+}$
	铈（Ce）	Ce^{4+}-Ce^{3+}

1　基于价态与毒性关联性构建“变价”纳米递送系统

针对元素在不同价态下表现出不同毒性和药理作用的特点，有研究者将低毒性化合价态的金属基药物作为前药应用于肿瘤治疗，实现药物减毒增效的目的。同时，也可利用某些纳米材料优良的生物降解性以减少对机体的毒副作用。本部分介绍了元素砷和钼基于不同价态下毒性差异构建与之对应的纳米递送系统。

1.1　砷

三氧化二砷（arsenic trioxide，ATO）是中药砒霜的活性成分，其对多种实体瘤如肝细胞癌有良好的治疗效果 [14]，主要利用 TME 中过度表达的小分子物质提高肿瘤靶向治疗效率。然而，高剂量的 ATO 会引起正常组织的严重不良反应，阻碍了 ATO 的临床应用。

单质砷应用于肿瘤治疗时具有选择性，对正常细胞、组织毒性较 ATO 小 [15]，这与肿瘤细胞内存在的高氧化应激密切相关，使砷从较低毒性的 As^0 转化为较强毒性的氧化态 As^{3+}，产生良好的治疗效果，而对正常组织无明显影响。在此研究的基础上，Liu 等 [16] 开发了一种新型砷类抗肿瘤药物聚乙二醇化砷纳米点（ASNDs@PEG）。ASNDs@PEG 药物进入肿瘤细胞，引发单质砷氧化，As^{3+} 使细胞内超氧化物歧化酶下降、活性氧（reactive oxygen species，ROS）增加，破坏平衡、引起损伤、阻滞周期，导致肿瘤细胞死亡并有效抑制其增殖能力。与正常细胞相比，ASNDs@PEG 处理后的肿瘤细胞的克隆明显受到抑制。阿霉素（doxorubicin，DOX）治疗肿瘤时，虽具有一定疗效但毒副作用较大，比较两种药物治疗效果，ASNDs@PEG 未出现与注射相同剂量 DOX 的小鼠体重与主要器官重量明显减轻的现象，且肿瘤抑制率更高，这表明该纳米药物的安全性与疗效比 DOX 更优。此外，ASNDs@PEG 还可作为引发光热疗法（photothermal therapy，PTT）的体内光热剂，可与其他临床化疗药物联合使用加强疗效 [16]。

为提高单质砷基纳米药物的稳定性，Hu 等 [17] 通过将砷原子固定在砷磷（arsenic phosphorus，AsP）纳米片基质中，并采用牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）改性提高稳定性，设计了 AsP-BSA 纳米片。基于 AsP 纳米片的近红外二区光吸收及强光热转换效率，不仅可以实现局部肿瘤热疗，还可发挥协同作用使低毒 / 无毒 AsP 转化为剧毒 ATO，以此触发细胞凋亡等内在机制治疗肿瘤。AsP-BSA 纳米片对肿瘤有一定程度的抑制，且协同近红外光（near-infrared，NIR）辐射治疗表现出最佳的治疗效果：小鼠体内肿瘤完全消除，并在治疗

后 2 个月内保持健康，未复发。

鉴于砷在不同价态下具有不同毒性，五价砷可作为前药，在 TME 中被谷胱甘肽（glutathione，GSH）还原为毒性较强的 As^{3+}[18]，从而减轻 ATO 对主要器官的毒性。Li 等[19]构建了叶酸（folate，FA）和基质金属蛋白酶 2（matrix metalloproteinase 2，MMP2）响应性细胞穿透肽共修饰脂质体包覆的砷酸钙纳米颗粒（FA/PF-LP-CaAs）。砷酸盐暴露于 GSH 将 As^{5+} 还原为 As^{3+}，这一过程可显著增加细胞内 ROS，促进细胞膜破裂导致细胞死亡。对注射后荷瘤裸鼠的主要器官进行体外荧光成像，结果表明细胞外基质中过度表达的 MMP2 和细胞膜上以 FA 受体为特征的 TME 可以特异性靶向肿瘤并增强药物积累。经 FA/PF-LP-CaAs 处理的荷瘤裸鼠肿瘤体积明显小于其他组，且表现出更高的存活率。

1.2 钼

稀有金属钼已被发现可应用于贫血、威尔逊氏病和肿瘤等疾病的治疗。目前应用于肿瘤光热治疗的小分子或纳米基药物存在药物过度积累和脱靶加热等缺点，对正常组织产生毒副作用。Zhang 等[20]合成了一种基于钼的多氧金属酸盐，是一种理想的具酸性和还原性双敏感性的 NIR 光热剂，通过 Mo^{5+} 和 Mo^{6+} 之间的电荷转移使其具有 NIR 光热转换行为。同时，这一物质可在血液循环中实现小分子快速消除而排出体外[21]，减少毒副作用。基于肿瘤细胞中异常 GSH 浓度可能会破坏氧化还原稳态，Gong 等[22]制备双金属氧化物 $MnMoO_x$ 纳米探针，通过体内肿瘤光声成像实现 GSH 的检测。GSH 激活后，氧化物 $MnMoO_x$ 中的 Mo^{6+} 被还原为 Mo^{5+}，纳米探针表现出较强的 NIR 吸收。同时，该纳米探针显示出良好生物降解性，可减少对机体的潜在毒性，对肿瘤特异性成像与 PTT 有一定发展意义。

Xu 等[23]通过白蛋白介导、生物矿化合成非晶态硫化钼纳米催化剂，是一种具有良好安全性、无需提供外界能量支持的 H_2O_2 特异性纳米催化剂。当混合价态 Mo^{4+} 及 Mo^{6+} 存在的硫化钼处于高浓度 H_2O_2 肿瘤环境时，Mo^{4+} 变价为 Mo^{6+}，催化 H_2O_2 生成 $O_2^{\bullet -}$；Mo^{6+} 生成 O_2，表现出较高的催化活性并介导 ROS 的生成。小鼠体内肿瘤治疗实验表明，该钼基纳米催化剂具有良好的生物安全性且可明显抑制肿瘤。

2 基于药物控释构建“变价”纳米递送系统

随着对药效药理学临床分析的深入研究，缓控释药物逐渐进入人们的视野，缓控释药物可改善术后疼痛、降低药物毒副作用、延长药物作用时间、提高药物的生物利用度等。本部分将重点介绍铁、锰金属基纳米药物利用特异性介导基质释放药物、实现价态转变等从而实现肿瘤治疗。

2.1 铁

铁元素在生物医学应用中具有多种优势，可用于肿瘤治疗。TME 中乳酸过多常导致肿瘤化疗的耐药性[24]。因此，消耗 TME 中过量乳酸可作为化疗有效治疗的策略之一。Wang 等[25]利用兼性厌氧菌呼吸消耗乳酸[26]和介导电子转移[27]的能力，构建了一种自驱动生物反应器 SO@MDH（Shewanella oneidensis MR-1，SO）。SO 靶向肿瘤部位进行乳酸厌氧代谢的同时将电子转移给纳米颗粒的关键组分 Fe^{3+}。TME 中的乳酸会被 SO 持续消耗，Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+}。随后，金属有机骨架降解导致药物迅速释放，还原产生的 Fe^{2+} 又可被 TME 中过度表达的 H_2O_2 重新氧化为 Fe^{3+}，进行治疗。为评价 SO 介导药物的释放能力，研究了其纳米颗粒对药物 DOX 的释放行为，发现 SO 代谢可快速触发纳米颗粒降解，即 DOX 的释放。随后，进行 4T1 小鼠模型的体内治疗实验，发现 SO 具有良好的肿瘤组织靶向能力且可显著抑制原位 4T1 肿瘤的生长，具有良好的生物安全性及耐药性。

2.2 锰

锰作为具有多种生物活性的无机微量元素，在肿瘤的先天免疫感应中起关键作用[28]。例如，Mn^{2+} 是一个优良的肿瘤免疫激活剂，缺少 Mn^{2+} 将导致肿瘤发病率显著增加。一些以锰离子为基础的纳米材料在生物医学领域取得了巨大的进展。Wan 等[29]设计了一种可同时实现胞内 GSH 消除及 ROS 可控产生的智能递送系统，改善肿瘤部位光动力学疗法（photodynamic therapy，PDT）的治疗效果。Mn^{3+} 与卟啉（porphyrin，TCPP）配位合成金属有机骨架（MOFs）纳米体系，其中 Mn^{3+} 作为封印剂不仅可以抑制 ROS 产生，还会淬灭基于 TCPP 的荧光。MOFs 被肿瘤细胞内吞后，在 TME 中被高浓度 GSH 分解成游离的 TCPP 和 Mn^{2+}，从而实现抗氧化剂 GSH 消耗，并激活基于 TCPP 的荧光成像及基于 Mn^{2+} 的磁共振成像。通过 GSH 控释 TCPP，可在光照下实现可控的 ROS 生成，从而实现对肿瘤部位的治疗。通过建立荷瘤小鼠模型进一步考察 MOFs 的抗肿瘤作用，显示可有效抑制肿瘤生长且具有良好的生物安全性。

TME 响应的可降解二氧化硅纳米颗粒因其能有效降低体内积累毒性而被作为药物给药和控释材料使用[30]。Tang 等[31]设计了索拉非尼（sorafenib，SFB）负载的锰掺杂二氧化硅纳米颗粒（MnMSN@SFB）。MnMSN@SFB 对酸和还原性环境较为敏感，在 TME 中 -Mn-O- 易断键，被降解生成具 ROS 催化能力的 Mn^{2+}，释放 SFB，实现肿瘤部位 GSH 双重消耗，表现出有效的抗肿瘤活性。

3 基于氧化还原内稳态调控构建“变价”纳米递送系统

化学动力学治疗（chemodynamic therapy，CDT）是一种新兴的肿瘤治疗手段，常通过化学制剂催化并基于 TME 辅助瘤内发生 Fenton 或类 Fenton 反应将 H_2O_2 分解产生 ROS 以破坏蛋白质、脂质、DNA 等生物大分子致细胞凋亡或坏死，本部分将重点介绍钴、铜、钒及铈金属基纳米递送系统通过介导 Fenton 反应实现肿瘤治疗。

3.1 钴

钴与铁性质相似，含钴化合物已被用于 H_2O_2 的催化分解反应。有研究发现钴基纳米药物 Co_3O_4 NPs 具 pH 依赖多酶活性，在酸性条件下，其表现出类过氧化物酶活性；在碱性和中性条件下，可催化 H_2O_2 快速分解[32]。Yang 等[33]提出了一种 PTT、CDT 协同治疗肿瘤的策略，制备前体药物 CoPy，该纳米颗粒作为一种酸依赖氧化剂，在正常生理环境下对正常组织毒副作用较小。当暴露于酸性 TME（pH 5.0）时，释放的 Co^{3+} 可转化为 Co^{2+}，以产生 • OH 介导 Fenton 反应。小鼠尾静脉注射药物进行血液学实验和正常组织 HE 染色，发现 CoPy 具较高的生物安全性。用药小鼠与其他对照组相比未观察到明显的体重下降，且在治疗周期内 4T1 肿瘤生长受到显著抑制，协同激光治疗抑制效果更佳。

3.2 铜

近年来铜元素作为一种新兴金属在抗肿瘤纳米药物研究中广泛应用[34]。与 Fe^{2+} 相比，铜基纳米药物因其广泛的催化活性而引起重视[35-36]。Wang 等[37]在水溶液中以摩尔比为 4∶1 的 5'- 鸟苷单磷酸和 Cu^{2+} 自组装构建了混合价铜基（Cu^{+}/Cu^{2+}）纳米配位聚合物（Cu-NCP）以协同增强电离辐射进行肿瘤免疫治疗，并取得了显著成效。该聚合物在诱导 Cu^{+} 产生 • OH 的同时，Cu^{2+} 也可触发 GSH 的消除。在体内评估 Cu-NCP 对肿瘤细胞的治疗效果，发现单独给药或放射治疗（radiotherapy，RT）仅起到轻微的抑制作用，但联合 Cu-NCP 治疗时，发生明显的肿瘤生长抑制协同效应。3 种染色评估数据表明 Cu-NCP 协同增敏 RT 以诱导 DNA 损伤并抑制体内肿瘤的生长。

目前，主要以利用 TME 中过表达的 H^{+}、GSH 等一些小分子来调节铜基纳米材料价态。Wang 等[38]合成了一种新的声敏剂（Cu^{2+}NS）用于声动力学治疗，即通过 TME 中过量的 GSH 增强 Cu^{2+}NS 向一价转换提高治疗选择性。进行荷瘤小鼠体内实验发现该试剂与其他组相比具有明显抑制肿瘤体积生长的作用，且不影响小鼠体重。此外，Cu^{2+}/Cu^{+}的可循环利用可解决肿瘤部位 ROS 不足的问题[39]。

3.3 钒

钒元素对地球上多种物种至关重要，其中多种价态中，$V^{4+/5+}$ 价态在生物学上影响较大。钒氧化物及其混合价氧化物（VO_x），近年来已被报道具有优越的酶活性及较强的环境敏感性[40]。鉴于此，Chen 等[41]采用鞣酸（tannic acid，TA）与偏钒酸胺组装制备含 VO_x 纳米片的 TA 混合物（TA@VO_x NSs），具有良好的光热效应，以此实现 PTT 及 CDT 联合疗法治疗肿瘤。据 X 射线光电子能谱技术实验分析，VO_x 纳米片主要以 V^{4+} 及 V^{5+} 混合价态存在，且具依赖 pH 的过氧化物酶样活性，通过混合价态之间的相互转化，可有效催化 H_2O_2 分解产生 • OH。建立荷瘤小鼠模型进一步考察体内治疗效果，证明该纳米药物在 PTT 及 CDT 的协同治疗下，有良好的抗肿瘤效果及生物安全性。

3.4 铈

铈具有广泛的生理活性，研究发现其金属氧化物 CeO_2 纳米颗粒表现出强大的抗肿瘤活性[42]。目前基于 Ce^{3+}/Ce^{4+} 之间的自由转化，可构建 CeO_2 纳米递送系统实现肿瘤治疗。研究发现低剂量 CeO_2 纳米颗粒在不同价态比下所产生的毒性差异极小[43]，但不同价态会造成 CeO_2 储氧放氧能力不同，因此可利用该特点实现针对治疗。

随着紫外研究的发展，CeO_2 也被证明具有屏蔽紫外线的作用[44]，与常用紫外屏蔽剂不同的是，其利用该金属离子变价可作为抗氧化剂，减少紫外诱导损伤[45]。CeO_2 也可通过变价作为一种促氧剂解决 TME 缺氧问题[46-47]。Zeng 等[48]在透明质酸水溶液中加入 $CeCl_3 \cdot 7H_2O$，搅拌后缓慢添加浓氨纯化得 CeO_2 纳米酶并同光敏分子合成制备 ICG@PEI-PBA-HA/CeO_2。CeO_2 纳米酶与过氧化氢酶类似，在 H_2O_2 环境中通过 Ce^{4+} 转变为 Ce^{3+} 催化降低底物中 H_2O_2 的浓度，当处黑暗

环境一段时间后又可再生为初始物；使用流式细胞仪量化肿瘤细胞中 ROS 的产生情况，并比较小鼠肿瘤治疗效果，结果表明 CeO_2 纳米酶增加肿瘤细胞中 ROS 的生成，并协同 PDT 增强疗效，使用该药物治疗后小鼠肿瘤体积最小。

4 结论与展望

本文综述了基于纳米药物原位变价治疗肿瘤的最新研究进展。这些纳米颗粒药物因价态不同而具有不同生理药理活性。依赖于肿瘤组织不同于其他正常组织的微环境，以毒副关联性、药物控释性能及 Fenton 反应原理等不同方式实现纳米药物“变价”系统，从而达到治疗目的。尽管其在药物递送和协同治疗肿瘤方面表现出了强大的应用前景，但仍存在一些问题。首先，简单构建以元素安全价态存在的稳定纳米平台具有挑战性，自然界普遍存在的价态一般不是作为前药纳米递送系统的最优来源。其次，基于 TME 的复杂情况，价态转变的效率难以调控，构建的纳米递送系统一般也无法避免该金属的过度氧化还原行为且难以系统研究，这导致很难将其应用于临床。最后，巧妙利用如 Fenton 反应产生的 ROS 是肿瘤治疗的关键之一，但金属变价后所形成的价态金属离子有时会减弱甚至终止 Fenton 反应，使催化效率大大减慢。因此对微环境响应“变价”纳米递送系统治疗肿瘤这一方案还需要坚持不懈的努力。

总体而言，构建不同价态的原位转化体系有望实现高效低毒地治疗肿瘤。调控价态的策略不仅提高了肿瘤的治疗指数，而且激发了纳米材料设计的更多想法，在纳米抗肿瘤药物领域拥有广阔的治疗前景。

参考文献

[1] Guo XM，Wu Z，Li W，et al. Appropriate size of magnetic nanoparticles for various bioapplications in cancer diagnostics and therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2016，8（5）：3092-3106.

[2] 尹孝莉，周思敏，吴方雨，等 . 新藤黄酸纳米乳的制备、表征以及体外抗肿瘤药效学的研究 [J]. 中南药学，2021，19（4）：565-572.

[3] 郭惠婕，姜文姣，缪明星，等 . 抗肿瘤纳米药物的靶向递送及药代动力学模型研究进展 [J]. 中南药学，2020，18（1）：74-79.

[4] 江文心，张华清，丁杨，等 . 抗肿瘤多药联用型纳米递送系统的研究进展 [J]. 药学学报，2022，57（1）：1-12.

[5] Bilia AR，Piazzini V，Guccione C，et al. Improving on nature：the role of nanomedicine in the development of clinical natural drugs [J]. Planta Med，2017，83（5）：366-381.

[6] Zhang CY，Yan L，Gu ZJ，et al. Strategies based on metal-based nanoparticles for hypoxic-tumor radiotherapy [J]. Chem Sci，2019，10（29）：6932-6943.

[7] Kuchur OA，Tsymbal SA，Shestovskaya MV，et al. Metal-derived nanoparticles in tumor theranostics：potential and limitations [J]. J Inorg Biochem，2020，209：111117.

[8] Gawel AM，Singh R，Debinski W. Metal-based nanostructured therapeutic strategies for glioblastoma treatment——an update [J]. Biomedicines，2022，10（7）：1598.

[9] Akhtar MJ，Alhadlaq HA，Kumar S，et al. Selective cancer-killing ability of metal-based nanoparticles：implications for cancer therapy [J]. Arch Toxicol，2015，89：1895-1907.

[10] Del Solar V，Contel M. Metal-based antibody drug conjugates. Potential and challenges in their application as targeted therapies in cancer [J]. J Inorg Biochem，2019，199：110780.

[11] Alavi M，Kamarasu P，McClements DJ，et al. Metal and metal oxide-based antiviral nanoparticles：properties，mechanisms of action，and applications [J]. Adv Colloid Interface Sci，2022，306：102726.

[12] Mauro N，Scialabba C，Puleio R，et al. SPIONs embedded in polyamino acid nanogels to synergistically treat tumor microenvironment and breast cancer cells [J]. Int J Pharm，2019，555：207-219.

[13] Matysiak-Kucharek M，Czajka M，Sawicki K，et al. Effect of nanoparticles on the expression and activity of matrix metalloproteinases [J]. Nanotechnol Rev，2018，7（6）：541-553.

[14] Dilda PJ，Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs [J]. Cancer Treat Rev，2007，33（6）：542-564.

[15] 王红芯，韩旭，骆骄阳，等 . 雄黄及其成方制剂的药效和毒性研究进展 [J]. 中南药学，2017，15（4）：467-471

[16] Liu C，Sun S，Feng Q，et al. Arsenene nanodots with selective killing effects and their low-dose combination with ß -elemene for cancer therapy [J]. Adv Mater，2021，33（37）：2170292.

[17] Hu RZ，Dai C，Wang CM，et al. Engineering 2D arsenic - phosphorus theranostic nanosheets [J]. Adv Funct Mater，2021，31（25）：2101660.

[18] Vega L，Styblo M，Patterson R，et al. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2001，172（3）：225-232.

[19] Li CQ，Zhang K，Liu AD，et al. MMP2-responsive dual-targeting drug delivery system for valence-controlled arsenic trioxide prodrug delivery against hepatic carcinoma [J]. Int J Pharm，2021，609：121209.

[20] Zhang C，Bu WB，Ni DL，et al. A polyoxometalate cluster paradigm with self-adaptive electronic structure for acidity/reducibility-specific photothermal conversion [J]. J Am Chem Soc，2016，138（26）：8156-8164.

[21] Albanese A，Tang PS，Chan WCW. The effect of nanoparticle size，shape，and surface chemistry on biological systems [J]. Annu Rev Biomed Eng，2012，14：1-16.

[22] Gong F，Cheng L，Yang NL，et al. Bimetallic oxide MnMoOX nanorods for in vivo photoacoustic imaging of GSH and tumor-specific photothermal therapy [J]. Nano Lett，2018，18（9）：6037-6044.

[23] Xu Y，Yang WT，Han Y，et al. Biomimetic molybdenum sulfide-catalyzed tumor ferroptosis and bioimaging [J]. Small，2023，19（16）：e2207544.

[24] Apicella M，Giannoni E，Fiore S，et al. Increased lactate secretion by cancer cells sustains non-cell-autonomous adaptive resistance to MET and EGFR targeted therapies [J]. Cell Metab，2018，28（6）：848-865.

[25] Wang JW，Chen QW，Luo GF，et al. A self-driven bioreactor based on bacterium-metal-organic framework biohybrids for boosting chemotherapy via cyclic lactate catabolism [J]. ACS nano，2021，15（11）：17870-17884.

[26] Song RB，Wu YC，Lin ZQ，et al. Living and conducting：coating individual bacterial cells with in situ formed polypyrrole [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2017，129（35）：10652-10656.

[27] Yang CH，Aslan H，Zhang P，et al. Carbon dots-fed Shewanella oneidensis MR-1 for bioelectricity enhancement [J]. Nat Commun，2020，11（1）：1379.

[28] Lv MZ，Chen MX，Zhang R，et al. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy [J]. Cell Res，2020，30（11）：966-979.

[29] Wan SS，Cheng Q，Zeng X，et al. A Mn（Ⅲ）-sealed metal–organic framework nanosystem for redox-unlocked tumor theranostics [J]. ACS nano，2019，13（6）：6561-6571.

[30] Yu LD，Chen Y，Lin H，et al. Magnesium - engineered silica framework for pH - accelerated biodegradation and DNAzyme-triggered chemotherapy [J]. Small，2018，14（35）：1800708.

[31] Tang HX，Li CQ，Zhang Y，et al. Targeted Manganese doped silica nano GSH-cleaner for treatment of liver cancer by destroying the intracellular redox homeostasis [J]. Theranostics，2020，10（21）：9865.

[32] Dong JL，Song LN，Yin JJ，et al. Co_3O_4 nanoparticles with multi-enzyme activities and their application in immunohistochemical assay [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2014，6（3）：1959-1970.

[33] Yang Z，Zhang L，Wei JL，et al. Tumor acidity-activatable photothermal/Fenton nanoagent for synergistic therapy [J]. J Colloid Interface Sci，2022，612：355-366.

[34] Fratoddi I，Venditti I，Battocchio C，et al. Highly hydrophilic gold nanoparticles as carrier for anticancer copper（Ⅰ）complexes：loading and release studies for biomedical applications [J]. Nanomaterials，2019，9（5）：772.

[35] Bokare AD，Choi W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H_2O_2 in advanced oxidation processes [J]. J Hazard Mater，2014，275：121-135.

[36] Majouga AG，Zvereva MI，Rubtsova MP，et al. Mixed valence copper（Ⅰ，Ⅱ）binuclear complexes with unexpected structure：synthesis，biological properties and anticancer activity [J]. J Med Chem，2014，57（14）：6252-6258.

[37] Wang YX，Ding YW，Yao D，et al. Copper-based nanoscale coordination polymers augmented tumor radioimmunotherapy for immunogenic cell death induction and T-cell infiltration [J]. Small，2021，17（8）：2006231.

[38] Wang H，Guo JX，Lin W，et al. Open-shell nanosensitizers for glutathione responsive cancer sonodynamic therapy [J]. Adv Mater，2022，34（15）：2110283.

[39] Sun MD，Yang D，Wu FQ，et al. SiO_2 @ Cu_7S_4 nanotubes for photo/chemodynamic and photo-thermal dual-mode synergistic therapy under 808 nm laser irradiation [J]. J Mater Chem B，2020，8（26）：5707-5721.

[40] 李慧芬 . 钒氧化物及其纳米复合材料的模拟酶特性在生化分析中的应用研究 [D]. 北京：北京化工大学，2018.

[41] Chen T，Huang RT，Liang JW，et al. Cover feature：natural polyphenol-vanadium oxide nanozymes for synergistic chemodynamic/photothermal therapy [J]. Chem-Eur J，2020，26（66）：15048-15048.

[42] Alili L，Sack M，Karakoti AS，et al. Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions [J]. Biomaterials，2011，32（11）：2918-2929.

[43] Dunnick KM，Morris AM，Badding MA，et al. Evaluation of the effect of valence state on cerium oxide nanoparticle toxicity following intratracheal instillation in rats [J]. Nanotoxicology，2016，10（7）：992-1000.

[44] 陶宇，沈娟娟，李树白，等 . 碳纳米管 /CeO_2 静电自组装制备及其抗紫外线性能 [J]. 纺织学报，2014，35（10）：7-10.

[45] Caputo F，De Nicola M，Sienkiewicz A，et al. Cerium oxide nanoparticles，combining antioxidant and UV shielding properties，prevent UV-induced cell damage and mutagenesis [J]. Nanoscale，2015，7（38）：15643-15656.

[46] Liu Z，Li JP，Chen WE，et al. Light and sound to trigger the Pandora’s box against breast cancer：a combination strategy of sonodynamic，photodynamic and photothermal therapies [J]. Biomaterials，2020，232：119685.

[47] Lan MH，Zhao SJ，Liu WM，et al. Photosensitizers for photodynamic therapy [J]. Adv Healthc Mater，2019，8（13）：1900132.

[48] Zeng L，Cheng H，Dai YW，et al. In vivo regenerable cerium oxide nanozyme-loaded pH/H_2O_2-responsive nanovesicle for tumor-targeted photothermal and photodynamic therapies [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2020，13（1）：233-244.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-04-05）

海藻多糖的抗病毒活性及其机制的研究进展

高星熠[1]，张诗悦[1]，张伟[2, 3]，张亮[2, 3]，陈九[2, 3]，闫滨[1*]，杨宏军[2, 3*]（1. 山东中医药大学，济南 250100；2. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所，山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室，济南 250100；3. 农业农村部畜禽生物组学重点实验室，济南 250100）

摘要：海藻多糖是海藻的主要组成成分，近年来受到国内外学者的高度重视，研究发现，海藻多糖结构复杂，具有多种生理活性，尤其具备显著的抗病毒活性。本文主要对国内外海藻多糖的抗病毒活性和相关作用机制研究进展进行总结，并对海藻多糖混合物的分离纯化方式进行总结和整理，以期为海藻多糖抗病毒活性的研究提供发展方向，并对关键性问题提供建议，促进海藻多糖在抗病毒新药研发方面发挥更重要的作用。

关键词：海藻多糖；抗病毒活性；机制；研究进展

中图分类号：R932，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1852-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.026

Research progress in antiviral activities of seaweed polysaccharides and related mechanism

GAO Xing-yi[1], ZHANG Shi-yue[1], ZHANG Wei[2, 3], ZHANG Liang[2, 3], CHEN Jiu[2, 3], YAN Bin[1*] YANG Hong-jun[2, 3*] (1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, *Jinan* 250100; 2. *Shandong Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding*, *Institute of Animal Science and Veterinary Medicine*, *Shandong Academy of Agricultural Sciences*, *Jinan* 250100; 3. *Key Laboratory of Livestock and Poultry Multi-omics of MARA*, *Jinan* 250100)

Abstract: Seaweed polysaccharide is the main component of seaweed. In recent years, it has been deeply valued by scholars at home and abroad. Seaweed polysaccharide has complex structure and various physiological activities, especially significant antiviral activity. This paper mainly summarized the research progress in the antiviral activity of seaweed polysaccharides and related mechanism at home and abroad, and summarized the separation and purification methods of seaweed polysaccharide mixtures. We aim to provide reference for the study of the antiviral activity of seaweed polysaccharide and determine its important role in the development of new antiviral drugs.

Key words: seaweed polysaccharide; antiviral activity; mechanism; research progress

多糖是一种天然的高分子聚合物，通常由多个单糖通过糖苷键链接存在，广泛存在于动植物和微生物中，是生命活动不可或缺的大分子物质[1]，海藻多糖是从海洋藻类中提取的多糖混合物的统称，根据来源不同主要分为绿藻多糖、褐藻多糖和红藻多糖[2]，目前广泛运用于医学、食品行业及工农业中，具有抗肿瘤、抗炎、调节免疫和抗病毒等活性[3-5]。

病毒感染一直是影响人和动物健康的重要因素，一方面是因为病毒在不断地适应、突变、进化，另一方面是抗病毒药物紧缺。一种行之有效的抗病毒药物，必须在杀伤病毒的同时对宿主细胞产生尽量小的副作用，海藻多糖具有高活性、低成本、低毒副作用及低耐受性的独特优势[6]。本文对海藻多

基金项目：国家现代农业产业技术体系资助（No.CARS36）；山东省重点研发计划（乡村振兴科技创新提振行动计划）项目“预制菜全链条智慧生产技术创新与应用”（No.2022TZXD0021）。

作者简介：高星熠，男，硕士，主要从事中药抗病毒及细胞免疫学研究，email：1462307176@qq.com *通信作者：闫滨，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事中药及中药天然产物活性分离研究，email：robinyan2002@163.com；杨宏军，男，研究员，主要从事奶牛疾病相关工作，email：longfei1997@sina.com

糖及其衍生物的抗病毒活性和作用机制进行综述，以期为抗病毒新药研发提供新的方向。

1 海藻多糖的抗病毒活性

海藻多糖抗病毒活性的研究始于 20 世纪六七十年代，Deig 等 [7] 发现海藻多糖对单纯疱疹病毒（HSV）具有抑制作用，使海藻多糖成为抗病毒药物的有效来源之一。经过了数十年的相关研究，已从藻类中分离出多种海藻多糖并对相关结构进行了解析，多项研究表明，海藻多糖对有囊膜的病毒具有较强抗病毒活性，包括正黏病毒科、副黏病毒科、冠状病毒科、反转录病毒科、疱疹病毒科等。

1.1 正黏病毒科

正黏病毒科是与黏液蛋白具有特殊亲和性病毒中的一科，又叫流感病毒群。该科病毒能引起人和畜禽的流行性疾病，严重时会造成死亡 [8]。

Hayashi 等 [9] 从裙带菜中提取的岩藻聚糖在体外和体内实验中均具有显著抗 A 型流感病毒（IAV）的效果。Hashem 等 [10] 发现采用 IAV 感染 MDCK 细胞后，再使用岩藻聚糖处理细胞，能显著增加细胞活力，抑制病毒复制。Martina 等 [11] 发现卡拉胶和神经氨酸抑制剂扎那米韦的联合鼻腔喷雾可用于流感的预防和治疗，感染前后 36 h 对小鼠进行滴鼻联合治疗，小鼠存活率均大于 50%。Jang 等 [12] 研究了 λ- 卡拉胶对流感病毒感染 MDCK 细胞的抗病毒活性，体内相关实验均证明 λ- 卡拉胶有显著抗 IAV 活性，鼻腔给予感染小鼠 5 mg • mL^{-1} 的 λ- 卡拉胶就能减轻病毒引起的体重下降，小鼠存活率约为 60%。来自红藻的 ι- 卡拉胶已经于欧美上市，用于流感等病毒的治疗，研究表明经过 ι- 卡拉胶治疗的患者在 21 d 的观察期内，疾病持续时间缩减了近 2 d（$P < 0.05$），复发次数显著减少（$P < 0.05$）[13]。同时有文献分析了临床上鼻用卡拉胶对儿童和成人的影响 [14]，结果表明，与安慰剂组比较，鼻用卡拉胶对所有感冒的恢复率提高了 54%（$P = 0.003$），其中 IAV 的恢复率平均增加了 119%，卡拉胶对短期感冒没有显著效果，长期感冒的风险降低了 71%（$P = 0.003$）。

1.2 冠状病毒科

冠状病毒是具有囊膜的一种 RNA 病毒，在自然界广泛存在。近年来，严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV）、中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV）和新型冠状病毒（SARS-CoV-2）在世界范围内广泛传播，造成大量人员死亡和财产损失，这些冠状病毒具有高致病性，可感染人的呼吸道，造成严重的呼吸道疾病和肺部损伤 [15]。

Kwon 等 [16] 从海带中提取高度支化的硫酸化海藻多糖 RPI-27 具有体外抗 SARS-CoV-2 的作用，由于 RPI-27 的分子量高，可以多点位结合 SARS-CoV-2 的表面 S 蛋白，表明 RPI-27 可以作为诱饵干扰宿主组织中 S 蛋白和硫酸乙酰肝素辅助受体的结合，进而抑制了病毒复制。Martina 等 [17] 发现 SARS-CoV-2 感染后的 Vero-B4 细胞，使用 ι-、κ- 和 λ- 卡拉胶分别进行抗病毒活性实验，结果显示，当使用 10 μg • mL^{-1} 的 ι- 卡拉胶时，病毒载量降低了 80%。同时他们还检测了来自裙带菜的高分子量褐藻凝胶，其在 100 μg • mL^{-1} 时，有效地减少了 50% 的病毒感染。Song 等 [18] 发现褐藻多糖表现出显著的抗 SARS-CoV-2 感染 Vero-E6 细胞效果，有效药物质量浓度在 3.90 ～ 500 μg • mL^{-1}。

1.3 疱疹病毒科

疱疹病毒是具有囊膜的双链 DNA 病毒，感染宿主广泛，主要侵害黏膜、皮肤以及神经组织，引起的疾病类型多样，严重危害人类和畜禽健康。

Hayashi 等 [19] 发现从褐藻中提取的褐藻糖胶表现出了广泛抗疱疹病毒活性，临床前实验已经证明褐藻糖胶对 HSV-1 和 HSV-2 具有抗病毒活性，Lee 等 [20] 的相关实验也证实了这一点。Angélica 等 [21] 对绿藻的相关提取物进行抗 HSV-1 和 HSV-2 的活性研究，结果表明，来自绿藻的裂片石莼（*Ulva fasciata*）、刺松藻（*Codium decorticatum*）和头状画笔藻（*Penicillus capitatus*）有较高的抗 HSV-1 活性，来自褐藻的马尾藻（*Sargassum cymosum*）和棕叶藻属带状体（*Stypopodium zonale*）有抗 HSV-1 和 HSV-2 活性，这种抗病毒活性可能是相关提取物具有高浓度的多糖成分所导致的。Hugo 等 [22] 分别评估了从法国和墨西哥收集提取的硫酸化海藻多糖的体外抗疱疹病毒的活性，其中红藻属提取的海膜（*Halymenia floresii*）的药物毒性小，而且具有显著的抗疱疹病毒活性。Vissani 等 [23] 发现从杉藻属成分 *Gigartina skottsbergii* 中提取得到的 λ- 卡拉胶在体外对各种疱疹病毒 [如 HSV-1、HSV-2、马疱疹病毒 3 型（EHV-3）、牛疱疹病毒 1 型（BoHV-1）、猪疱疹病毒 1 型（SuHV-1）、猫疱疹病毒 1 型（FeHV-1）] 在体外均有一定的抗病毒效果，并推断很可能是卡拉胶与病毒囊膜糖蛋白结合，阻断了病毒与细胞的结合，进而起到抗病毒效果。

近年来，更多的海藻多糖也已被证实具有抗其他病毒的相关活性，Ren 等[24]发现一种海藻粗多糖（CSP）对于鱼的传染性造血器官坏死病毒（IHNV）和传染性胰腺坏死病毒（IPNV）具有一定抗病毒效果，CSP 的 CC_{50} 值为 4418 μg·mL^{-1}，并且 CSP 质量浓度在 100 ～ 300 μg·mL^{-1} 时，对 IHNV 病毒抑制率具有剂量依赖性，而在 CSP 质量浓度为 300 μg·mL^{-1} 时，且病毒感染复数为 0.1 和 1.0 时，分别达到峰值 61.44% 和 39.10%；而治疗 IPNV 时，CSP 质量浓度为 200 μg·mL^{-1} 时，抗病毒活性分别为 44.69% 和 32.58%。表明 CSP 具有一定抗病毒效果。

海藻多糖对相关病毒的抗病毒活性汇总见表 1。

表 1 海藻多糖分类及相关病毒

Tab 1 Classification seaweed polysaccharides and related viral

多糖来源	多糖名称	抗病毒活性	文献
绿藻	石莼聚糖	水疱性口炎病毒（VSV），单纯疱疹病毒（HSV），乙型脑炎病毒（JEV）	[25-27]
绿藻	浒苔多糖	禽流感病毒（AIV），犬冠状病毒（CCoV）	[28-29]
红藻	琼脂	单纯疱疹病毒 1 型（HSV-1），单纯疱疹病毒 2 型（HSV-2），乙型流感病毒（IFV-B），正腮腺炎病毒（MuV），登革热病毒（DenV-2），脑心肌炎病毒（EMCV），东部马脑炎病毒（EEEV），委内瑞拉马脑炎病毒（VEEV），西部马脑炎病毒（WEEV）	[30-31]
红藻	紫菜胶	人乳头瘤病毒 16 型（HPV-16），人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1），甲型流感病毒（IFV-A），丙型肝炎病毒（HCV）	[32-33]
红藻	卡拉胶	HSV-1，HSV-2，HIV，HPV，DENV-2，裂谷热病毒（RVFV），人类嗜 T 细胞病毒（HTLV），IAV，甲型 H1N1 流感病毒（H1N1）	[34-37]
褐藻	褐藻胶	HCV，HIV-1，DENV-2，淋巴囊肿病毒（LCDV），HSV-1	[38-40]
褐藻	褐藻淀粉	普通花叶病毒（TMV）	[41]
褐藻	褐藻糖胶	HIV，HSV-1，HSV-2，非洲猪瘟病毒（ASFV），HTLV-1，梅帕猴病毒（MPMV），DENV-2，人巨细胞病毒（HCMV），IFV-A	[9，42-43]

2 海藻多糖的抗病毒机制

海藻多糖的抗病毒机制随着多糖结构和病毒类型不同而有所差异[44-45]。总的来说分为三大类，一是通过干扰病毒的生命周期来抑制病毒复制（病毒的复制周期分为病毒吸附、病毒侵入、衣壳脱壳、生物合成、病毒组装和病毒释放 6 个基本阶段）；二是通过增强宿主的抗病毒免疫反应来提高宿主对病毒的清除；三是对病毒粒子的直接杀灭作用。

2.1 抑制病毒的吸附

病毒与宿主细胞的黏附是病毒感染的早期事件，是大多数病毒感染的先决条件。病毒的吸附首先需要通过静电作用结合到细胞表面，然后将这种不稳定的静电结合转变为与细胞表面受体的不可逆吸附，为下一步的病毒侵入做准备。

有相关研究表明，硫酸化海藻多糖所带的负电荷更容易引发静电相互作用，而这种静电相互作用是抗病毒活性的关键。多数硫酸化海藻多糖由于硫酸化基团的存在可以抑制病毒与靶细胞的结合过程，阻断病毒吸附进而起到抗病毒作用。Carlucci 等[46]发现从红藻中提取的 λ- 卡拉胶和适度环化的 μ/ι- 卡拉胶能有效抑制 HSV-1 和 HSV-2 的病毒吸附，与卡拉胶分子量和硫酸化程度有关，同时硫酸盐基团的分布也是抗 HSV 病毒活性的一个主要因素。Wongprasert 等[47]发现天然硫酸化半乳聚糖可通过与 WSSV 的病毒蛋白 VP26、VP28 结合进而抑制病毒与宿主细胞的吸附作用，Sotanon 等[48]报道硫酸化半乳聚糖抑制白斑综合征病毒（WSSV）病毒蛋白 VP37 的 C 端结构域，该结构区域负责与虾血细胞结合，WSSV 可被半乳聚糖阻断，使其无法与虾血细胞结合进而起到抗病毒效果。Thuy 等[49]发现褐藻糖浆与 HIV-1 病毒预先孵育，抑制了 HIV-1 的吸附，进而阻断 HIV 和相关靶细胞的结合。

同时，也有部分非硫酸化多糖也在吸附阶段起到抗病毒效果，Wang 等[50]从绿藻中提取到一株名为 MWS 的水溶性多糖，通过与病毒颗粒结合，在病毒吸附前或吸附过程中能很大程度地抑制 EV-71 感染。Ren 等[24]采用不同方式将提取到的粗多糖 CSP 作用于 IPNV 和 IHNV，发现 CSP 在体外实验中，更多地在吸附阶段起到抗病毒效果。但这部分多糖在病毒吸附阶段的效果与构效关系的关联性还需进一步探究。

2.2 抑制病毒的侵入和脱壳

病毒的侵入过程通常涉及到内吞摄取和囊泡转运，脱壳一般在病毒内化入宿主细胞后进行，有些噬菌体也会在内化的同时脱壳。硫酸化的海藻多糖可以通过阻断病毒颗粒的变构来干扰病毒

的内化和脱壳，也可以通过干扰病毒从内体释放到细胞质来抑制病毒的增殖。

卡拉胶可以与 HPV 的衣壳蛋白结合而抑制病毒的吸附、侵入和脱壳，卡拉胶类似于硫酸乙酰肝素，是 HPV 细胞黏附因子，卡拉胶对 HPV 的黏附作用是硫酸乙酰肝素的 3 倍。同时，卡拉胶可以与 DENV 的囊膜糖蛋白 E 直接结合来抑制 DENV 的脱壳。还可以干扰 HRV 内化过程中病毒颗粒的变构而影响病毒的极早期复制 [51]。Wang 等 [52] 发现从褐藻中提取到的岩藻聚糖 KW 可通过与病毒神经氨酸酶结合并抑制其活性，同时通过抑制细胞表皮生长因子（EGFE），抑制细胞内吞进而起到抗 IAV 的作用。

2.3 抑制病毒的转录、复制

海藻多糖抑制病毒生物合成的机制可能是其对病毒复制相关的酶或其他胞内靶标的直接干扰。

卡拉胶能够抑制 DENV 病毒蛋白的合成，通过影响宿主细胞的潜在靶标来抑制 DENV 在蚊子体内的复制，可以抑制 IFV-A mRNA 的转录和蛋白质翻译 [53]。Lopes 等 [25] 对石莼聚糖进行了抗 HSV 的实验，使用标记为 SU1F1 的硫酸化的石莼聚糖，发现其具有相关抗病毒活性，高浓度的 SU1F1 在感染后 8 h 表现出抗病毒作用，其抑制了 DNA 复制和转录，并下调了 HSV 蛋白合成水平。Cao 等 [54] 发现从褐藻海带中提取的多糖经乙醇沉淀后得到的提取物可有效抑制 HEK293 细胞中 RSV 病毒的复制，采用 ELISA 和 Western blot 检测 IFN-*α* 和 IRF3 的表达水平，结果发现提取物通过上调 IRF3 信号介导的 IFN-*α* 的产生进而抑制 RSV 病毒的复制。Silva 等 [55] 通过体外实验发现从绿藻中使用水煎液浸渍法制备的一种多糖提取物，可以完全抑制 VERO 细胞中的 HMPV 病毒复制。Gomaa 等 [56] 发现红藻鱼栖苔属特异性卡拉胶和褐藻网胨藻特异性卡拉胶对 HSV-1 和裂谷热病毒（Rift Valley fever virus，RVFV）均有抑制作用，且对宿主 Vero 细胞毒性较小，分别通过 HSV-1 中 *P53* 基因和 RVFV 中 *BCL-2* 基因的扩增来实现。该研究还发现，一种 2 kDa 的 *κ*- 卡拉胶寡糖能有效抑制甲型 H1N1 流感病毒在 MDCK 细胞中的复制，呈现剂量依赖性，这种寡糖在进入细胞后抑制了 H1N1 病毒的 mRNA 和蛋白表达从而达到抑制病毒复制效果。

2.4 对病毒的直接杀灭作用

部分海藻多糖具有直接杀灭病毒的作用，有文献报道，卡拉胶通过阴离子相互作用与病毒囊膜蛋白形成稳定的复合体，导致病毒吸附在宿主细胞表面所必须的囊膜蛋白位点被占据，无法完成接下来的病毒感染过程，从而起到杀灭病毒的效果 [57-58]。卡拉胶可以通过与 HSV 紧密结合导致囊膜糖蛋白 B 和 C 的蛋白结构变化造成病毒粒子灭活，最终有效减少病毒的增殖。

2.5 增强宿主免疫功能

多糖除了具有直接抗病毒效果外，也有间接抗病毒效果。当病毒入侵宿主后，会触发机体免疫应答，免疫系统的激活对消灭病毒起到至关重要的作用。目前多项研究表明海藻多糖参与免疫系统相互作用并激活多种信号通路进而保护细胞。

巨噬细胞、自然杀伤（NK）细胞、树突状细胞（DC）和 T 细胞都是机体重要的免疫细胞，参与机体免疫调节，抗病毒感染功能，有研究表明从褐藻中提取的褐藻糖胶通过刺激活化这些免疫细胞，增强机体抗病毒反应 [59]。同时褐藻多糖硫酸酯 [60] 通过 TLR4、分化抗原 14（CD14）和清除受体（SR）激活巨噬细胞，增强免疫调节功能。Hirokuni 等 [61] 使用褐藻糖胶处理 C57BL/6 级大鼠，给药 3 h 后，血清和脾胃细胞中促炎细胞因子 IL-6、IL-12、TNF-*α* 上调。Sotanon 等 [48] 用富含硫酸化半乳糖的饲料喂养 WSSV 感染的对虾，与对照组相比表现出较低的死亡率和较低的病毒蛋白 VP28 扩增，此外，硫酸化半乳聚糖处理提高了斑节对虾的超氧化物歧化酶、超氧阴离子、总血细胞水平以及多酚氧化酶活性等，提高了机体免疫水平，起到抗病毒效果。

3 海藻多糖优缺点分析及未来应用展望

海藻是一种分布极其广泛的天然资源，是天然抗病毒药物的重要来源，多糖是其最主要的成分之一，海藻多糖抗病毒可以单独使用，也可以与其他药物联用 [62]，作为佐剂提升抗病毒效果。但在使用海藻多糖抗病毒时，抗病毒的效果取决于多糖的化学结构，例如分子量大小、硫酸基团的数目和分布；同时多糖的提取分离方法不一，纯度不一致也会导致其抗病毒活性受到相应影响 [63]；不经常以海藻为基础进行治疗会导致抗病毒效果减弱 [64]；也有部分研究发现卡拉胶具有促凝血效果，抗病毒的同时可能引起其他部分不良反应 [65]。

总体来说，海藻多糖的来源广泛，简单易得、毒性较小是其最大的优点。作为一种天然化合物与其他化学合成药品共同使用已有先例，可以作为治疗感冒和相关疾病预防的药物使用 [66]，

同时可以有效优化药物成本，使其成为一种天然的、可持续、廉价的药品。海藻多糖在具有抗病毒效果的同时，也有抗氧化、减轻肥胖和调节肠道菌群[67-69]的功能，这也使其可以成为功能性食品和保健食品的重要来源，在药用和食用两方面均能够增加人们的生活质量。

4 讨论

病毒性疾病一直是危害人类和动物健康的重要元凶，而且近年来不断有新发或再发的病毒性疾病。如 SARS-CoV-2 和非洲猪瘟都造成了严重的经济损失和社会影响。尽管抗病毒药物的种类也在不断增加，但是受困于药物有效性、毒副作用、高昂的价格和药物耐受性等因素，抗病毒药物的紧缺问题并未得到有效缓解。疫苗接种是控制病毒性传染病的有效手段，但受限于研发周期长而不能有效应对新发病的快速传播和流行。因此，新型抗病毒药物的开发尤为重要，海藻多糖因其抗病毒活性高、来源丰富、成本和毒副作用低及耐受性低而受到越来越多的关注，有望成为抗病毒药物研发的新出路。海藻多糖在自然感染宿主体内的抗病毒效果仍需进一步探索。不仅如此，海藻多糖抗病毒的分子机制也需要在未来研究中进行更充分的阐明和揭示。解析其抗病毒活性的分子机制，对基于海藻多糖及其衍生物的抗病毒药物研发、提高病毒性疾病的应对能力具有重要意义。

参考文献

[1] 孙雨豪 . 低分子量羊栖菜多糖及其纳米胶束抗 ALV-J 病毒活性及机制研究 [D]. 青岛：中国科学院大学（中国科学院海洋研究所），2020.

[2] 郭建行，贾颂华，李博润，等 . 红海藻多糖提取、分离纯化及生物活性研究进展 [J]. 食品研究与开发，2022，43（16）：216-224.

[3] 钟悦，韩诗语，陈瑾，等 . 海藻多糖免疫调控活性研究进展 [J]. 食品安全导刊，2022，360（31）：116-120.

[4] Grice ID，Mariottini GL. Glycans with antiviral activity from marine organisms [J]. Results Probl Cell Differ，2018，65：439-475.

[5] 凌娜，李玮璐，汲晨锋，等 . 海藻多糖的化学结构及生物活性研究新进展 [J]. 中国海洋药物，2021，40（1）：69-78.

[6] Kang HK，Seo C，Park Y，et al. The effects of marine carbohydrates and glycosylated compounds on human health [J]. Int J Mol Sci，2015，16（3）：6018-6056.

[7] Deig EF，Ehresmann DW，Hatch MT，et al. Inhibition of herpesvirus replication by marine algae extracts [J]. Antimicrob Agents CH，1974，6（4）：524-525.

[8] 余翔 . 高致病性禽流感的诊断与预防措施 [J]. 今日畜牧兽医，2019，35（10）：96.

[9] Hayashi K，Lee JB，Hayashi T，et al. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity [J]. Microbes Infect，2013，15（4）：302-309.

[10] Hashem AM，Flaman AS，Aaron F，et al. Aurintricarboxylic acid is a potent inhibitor of influenza A and B virus neuraminidases [J]. PLoS One，2009，4（12）：e8350.

[11] Martina MK，Christiane K，Graf C，et al. The intranasal application of zanamivir and carrageenan is synergistically active against influenza a virus in the murine maodel [J]. PLoS One，2015，10（6）：e0128794.

[12] Jang YJ，Shin HQ，Lee MK，et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan against influenza viruses and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J]. Sci Rep，2021，11（1）：821.

[13] Martin K，Thomas L，Angelika B，et al. Carrageenan nasal spray in virus confirmed common cold：individual patient data analysis of two randomized controlled trials [J]. Multidiscip Resp Med，2014，9（1）：57.

[14] Harri H，Elizabeth C. Carrageenan nasal spray may double the rate of recovery from coronavirus and influenza virus infections：re-analysis of randomized trial data [J]. Pharmacol Res Perspe，2021，9（4）：e00810.

[15] Philip V，Annika K，Silvio S，et al. Coronavirus biology and replication：implications for SARS-CoV-2 [J]. Nat Rev Microbiol，2020，19（3）：155-170.

[16] Kwon PS，Oh H，Kwon SJ，et al. Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro [J]. Cell Discov，2020，6（1）：50.

[17] Martina MK，Philipp G，Maximilian G，et al. Iota-carrageenan neutralizes SARS-CoV-2 and inhibits viral replication in vitro [J]. PLoS One，2021，16（2）：e0237480-e0237480.

[18] Song S，Wang QL，Liu ZQ，et al. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2[J]. Food Funct，2020，11（9）：7415-7420.

[19] Hayashi K，Nakano T，Hashimoto M，et al. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection [J]. Int Immunopharmacol，2008，8（1）：109-116.

[20] Lee JB，Hashimoto M，Nakano T，et al. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of undaria pinnatifida（Mekabu）[J]. Chem Pharm Bull，2004，52（9）：1091-1094.

[21] Angélica RS，Marcela CS，Gabriella S，et al. Antiviral activity of extracts from brazilian seaweeds against herpes simplex virus [J]. Rev Bras Farmacogn，2012，22（4）：714-723.

[22] Hugo PC，Gilles B，Christel M，et al. Sulfated polysaccharides from seaweed strandings as renewable source for potential antivirals against herpes simplex virus 1 [J]. Mar Drugs，2022，20（2）：116-116.

[23] Vissani MA，Ciancia M，Zabal O，et al. Effects of lambda-carrageenan on equid herpesvirus 3 in vitro [J]. J Equine Vet Sci，2016，39：S61-S62.

[24] Ren GM，Zhao JZ，Shao YZ，et al. Antiviral activity of crude polysaccharide derived from seaweed against IHNV and IPNV in vitro [J].Viruses，2022，14（9）：2080-2080.

[25] Lopes N，Ray S，Espada SF，et al. Green seaweed enteromorpha compressa（Chlorophyta，Ulvaceae）derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus [J]. Int J Biol Macromol，2017，102：605-612.

[26] Aguilar-Briseño JA，Cruz-Suarez LE，Sassi JF，et al. Sulphated polysaccharides from ulva clathrata and cladosiphon okamuranus seaweeds both Inhibit viral attachment/entry and cell-cell fusion，in NDV infection [J]. Mar Drugs，2015，13（2）：697-712.

[27] Chi YZ，Zhang MF，Wang X，et al. Ulvan lyase assisted structural characterization of ulvan from ulva pertusa and its antiviral activity against vesicular stomatitis virus [J]. Int J Biol Macromol，2020，157：75-82.

[28] 孙秋艳，沈美艳，朱明恩，等 . 浒苔多糖体外抗犬冠状病毒临床分离株的作用研究 [J]. 动物医学进展，2017，38（7）：22-26.

[29] 于超，杜恒裔，谭子超，等 . 4 种浒苔多糖的体外抗禽流感病毒活性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医，2020，589（1）：106-109，113.

[30] Mazumde S，Ghosal PK，Pujol CA，et al. Isolation，chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata*（Gracilariaceae，Rhodophyta）[J]. Int J Biol Macromol，2002，31（1）：87-95.

[31] Geetha BR，Rando T. Potential antiviral properties of industrially important marine algal polysaccharides and their significance in fighting a future viral pandemic [J].Viruses，2021，13（9）：1817.

[32] Dabney WD，Anila FG，Giribabu L，et al. Sulfonated naphthyl porphyrins as agents against HIV-1 [J]. J Inorg Biochem，2004，99（3）：813-821.

[33] Kumar DA，Jiang SB，Nathan S，et al.Three-dimensional structure-activity analysis of a series of porphyrin derivatives with anti-HIV-1 activity targeted to the V3 loop of the gp120 envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type1 [J].J Med Chem，2002，37（8）：1099-1108.

[34] González ME，Alarcón B，Carrasco L，et al. Polysaccharides as antiviral agents：antiviral activity of carrageenan [J]. Antimicrob Agents CH，1987，31（9）：1388-1393.

[35] Carlucci MJ，Ciancia M，Matulewicz MC，et al. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types [J]. Antivir Res，1999，43（2）：93-102.

[36] Nina D，Manjari L，Meropi A，et al. Griffithsin carrageenan fast dissolving inserts prevent SHIV HSV-2 and HPV infections in vivo [J]. Nat Commun，2018，9（1）：3881.

[37] Andreas L，Christiane M，Marielle KS，et al. Iota-carrageenan is a potent inhibitor of influenza A virus infection [J]. PloS one，2010，5（12）：e14320.

[38] Ji YT，Sun XQ，Chen XG，et al. Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus（LCDV）to Japanese flounder [J]. Fish Shellifish Immun，2008，24（5）：592-599.

[39] Nallamuthu N，Braden M，Oxford J. Modification of pH conferring virucidal activity on dental alginates [J]. Materials，2015，8（4）：1966-1975.

[40] Lim GP，Ahmad MS. Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks [J]. J Ind Eng Chem，2017，56：382-393.

[41] 王杰，王开运，张骞，等 . 海带多糖对烟草花叶病毒的抑制作用及其对烟草酶活性的影响 [J]. 植物保护学报，2011，38（6）：532-538.

[42] Hayashi K. Defensive effects of a fucoidan from brown alga undaria pinnatifida against herpes simplex virus infection [J]. Int Immunopharmacol，2008，8（1）：109-116.

[43] Synytsya A，Bleha R，Pohl R，et al. Mekabu fucoidan：structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses [J]. Carbohyd Polym，2014，111：633-644.

[44] Damonte EB，Matulewicz MC，Cerezo AS，et al.Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents [J]. Curr Med Chem，2004，11（18）：2399-2419.

[45] Shi QM，Wang AJ，Lu ZH，et al. Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds [J]. Carbohyd Res，2017，453-454：1-9.

[46] Carlucci MJ，Pujol CA，Ciancia M，et al. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed gigartina skottsbergii and their cyclized derivatives：correlation between structure and biological activity [J]. Int J Biol Macromol，1997，20（2）：97-105.

[47] Wongprasert K，Rudtanatip T，Praiboon J，et al.Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed Gracilaria fisheri and development of resistance against white spot syndrome virus（WSSV）in shrimp [J]. Fish Shellfish Immun，2014，36（1）：52-60.

[48] Sotanon N，Saleeart A，Rattanarojpong T，et al. C-terminal domain of WSSV VP37 is responsible for shrimp haemocytes binding which can be inhibited by sulfated galactan [J]. Fish Shellfish Immun，2018，77：312-318.

[49] Thuy TTT，Ly BM，Van TTT，et al. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species [J]. Carbohyd Polym，2015，115：122-128.

[50] Wang SY，Wang W，Hou LK，et al. A sulfated glucuronorhamnan from the green seaweed monostroma nitidum：characteristics of its structure and antiviral activity [J]. Carbohyd Polym，2020，227（C）：115280.

[51] Andreas G，Regina W，Christiane M，et al. Iota-Carra-

geenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection [J]. Virol J，2008，5（1）：107.

[52] Wang W，Wu JD，Zhang XS，et al.Inhibition of influenza A Virus infection by fucoidan targeting viral neuraminidase and cellular EGFR pathway [J]. Sci Rep，2017，7（1）：40760.

[53] Wang W，Zhang P，Hao C，et al. In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus [J]. Antivir Res，2011，92（2）：237-246.

[54] Cao YG，Hao Y，Li ZH，et al. Antiviral activity of polysaccharide extract from *Laminaria japonica* against respiratory syncytial virus [J]. Biomed Pharmacother，2016，84：1705-1710.

[55] Silva MG，Ribeiro SA，Otaviano MF，et al. Antiviral activity of the green marine alga Ulva fasciata on the replication of human metapneumovirus [J]. Rev Inst Med Trop SP，2010，52（1）：3-10.

[56] Gomaa HH. Antiviral activity of sulfated polysaccharides carrageenan from some marine seaweeds [J]. Int J Pharm，2016，7：34-42.

[57] Carlucci MJ，Scolaro LA，Damonte EB. Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan：lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype [J]. J Med Virol，2002，68（1）：92-98.

[58] Nigam S，Singh R，Bhardwaj SK，et al. Perspective on the therapeutic applications of algal polysaccharides [J]. J Polym Environ，2021，7：785-809.

[59] Zhou GF，Sun YP，Xin H，et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from Chondrus ocellatus [J]. Pharmacol Res，2004，50（1）：47-53.

[60] 郭建行，贾颂华，李博润，等 . 红海藻多糖提取、分离纯化及生物活性研究进展 [J]. 食品研究与开发，2022，43（16）：216-224.

[61] Hirokuni N，Mari M，Hideki M，et al. Supplementation of elderly Japanese men and women with fucoidan from seaweed increases immune responses to seasonal influenza vaccination [J]. J Nutr，2013，143（11）：1794-1798.

[62] Manuel FJ，Edith L，Ariel D，et al. Efficacy of a nasal spray containing Iota-Carrageenan in the postexposure prophylaxis of COVID-19 in hospital personnel dedicated to patients care with COVID-19 disease [J]. Int J Gen Med，2021，14：6277-6286.

[63] Barroco HT，Chow F. Anti-HIV activity of methanolic and aqueous extracts of fifteen materials of beach-cast macroalgae：valorization of underused waste biomass [J]. Appl Phys，2022，3（1）：236-246.

[64] Stephanie SK，Ramjee G，Ahmed K，et al. Efficacy of carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa：a randomised，double-blind，placebo-controlled trial [J]. The Lancet，2008，372（9654）：1977-1987.

[65] Jang Y，Shin H，Lee MK，et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan against influenza viruses and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J]. Sci Rep，2021，11（1）：821.

[66] 高玥，许倩楠，蔡明刚，等 . 海洋来源药食同源品开发利用研究进展 [J]. 中草药，2021，52（17）：5455-5464.

[67] Graf C，Bernkop SA，Egyed A，et al. Development of a nasal spray containing xylometazoline hydrochloride and iota-carrageenan for the symptomatic relief of nasal congestion caused by rhinitis and sinusitis [J]. Int J Gen Med，2018，11：275-283.

[68] 刘昕，齐延民，张健，等 . 海藻多糖与肠道菌群相互作用研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报，2022，13（17）：5723-5729.

[69] 马杰，李婷，张媛，等 . 海藻中活性物质抗高血压与抗肥胖作用的研究现状 [J]. 食品安全质量检测学报，2022，13（6）：1711-1717.

（收稿日期：2023-02-27；修回日期：2023-04-27）

芳香烃受体在类风湿关节炎中作用及机制的研究进展

吕政伟，王宁，龚国清*（中国药科大学药学院，南京　211198）

摘要：类风湿关节炎是一种自身免疫性疾病，其发病机制尚未完全明确，受基因、环境、免疫等多种因素影响。芳香烃受体是一种配体依赖性的转录因子，在免疫细胞功能调节和骨稳定中发挥重要功能。因此，研究芳香烃受体在类风湿关节炎中发挥作用的机制具有重要意义。本文就芳香烃受体在类风湿关节炎中的作用机制进行综述，并讨论基于芳香烃受体靶点治疗药物的发展情况。

关键词：芳香烃受体；类风湿关节炎；自身免疫性疾病；免疫细胞
中图分类号：R96，R593.22　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1859-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.027

Research progress in the role and mechanism of aryl hydrocarbon receptor for rheumatoid arthritis

LYU Zheng-wei, WANG Ning, GONG Guo-qing* (*School of Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198)

Abstract: Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease without clear mechanism, and its pathogenesis is influenced by various factors such as genes, environment and immunity. Aryl hydrocarbon receptor is a ligand-dependent transcription factor which plays an important role in the regulation of immune cells and bone stabilization. It is important to determine the relationship between aryl hydrocarbon receptor and rheumatoid arthritis. The role of aryl hydrocarbon receptor in rheumatoid arthritis and the progress of related drugs were discussed to provide evidence and ideas for future research.

Key words: aryl hydrocarbon receptor; rheumatoid arthritis; autoimmune disease; immune cell

类风湿关节炎（RA）是一种慢性自身免疫性疾病，以进行性关节损伤为特征，可导致永久性残疾[1]。患者的主要临床症状为滑膜炎症、软骨侵蚀和骨损伤。RA 的发病机制尚不完全清楚，可能涉及基因易感性、环境和免疫等因素，免疫细胞的数量和功能与 RA 的病程密切相关[2]，并通过相应的细胞因子影响 RA 的炎症情况与骨损伤进程。

芳香烃受体（AhR）是一种配体激活的转录因子，参与机体对环境污染物的反应等诸多生理过程的调节[3]。既往研究表明，AhR 介导的信号通路可能对免疫调节的反应至关重要，AhR 信号通路的异常激活参与了包括多发性硬化症、系统性红斑狼疮[4]等在内的多种自身免疫性疾病的发展。AhR 的异常激活也参与了 RA 的发病。本文就 RA 研究中涉及 AhR 的新进展进行综述，讨论 AhR 信号通路参与 RA 发病的可能因素。

1　AhR 与 RA

AhR 通常与热休克蛋白（HSP）90、p23 等形成以 HSP90 为核心的蛋白复合物[5]，存在于细胞胞质中。当配体与 AhR 结合时，AhR 的构象被诱导，暴露核定位片段并发生核易位[6]。在细胞核中，AhR 与芳烃受体核易位体（ARNT）形成二聚体以产生活化的转录因子，并与外源反应元件（XRE）序列结合，启动 AhR 靶基因的表达[7]。AhR 的激活依赖于配体，包括了内源性和外源性的配体，例如犬尿氨酸（Kyn）、四氯二苯并二噁英（TCDD）、苯并 [a] 芘（BaP）、6- 甲酰

作者简介：吕政伟，男，硕士研究生，主要从事抗炎药理研究，email：imLZW@outlook.com　*通信作者：龚国清，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事抗炎、抗血栓药理研究，email：gonggq@hotmail.com

基吲哚并 [3，2-b] 咔唑（FICZ）等。AhR 受配体激活启动下游基因转录的过程如图 1 所示。

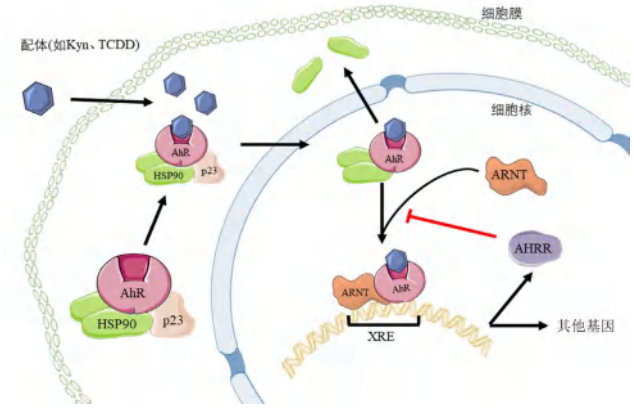


图 1 AhR 受配体激活启动转录的机制与芳烃受体抑制因子（AHRR）的负调控

Fig 1 Mechanism of AhR transcription after AhR activation and its negative regulation

AhR 在体内会受到两种方式的负调控：一种方式是在配体结合启动核转录后，AhR 可以通过 26S 蛋白酶体降解；另一种方式则是由 AHRR 参与的活性抑制。AHRR 的序列与 AhR 相似，可以竞争性地结合 ARNT 或者 XRE 结构域，实现对 AhR 活性的负调控 [8]。

近年来的研究表明，RA 的发生发展与 AhR 的异常有关。在 *AhR* 基因敲除的小鼠中观察到了骨愈合受损，软骨内骨化延迟等现象 [9]，提示 AhR 参与了骨骼稳定。而 RA 患者 *AhR* 基因特定位点甲基化水平显著高于健康者，且临床 RA 患者的关节滑膜中观察到了 *AhR* 基因表达的异常升高，表明 AhR 信号的过度激活也可能通过 T 细胞、巨噬细胞、破骨细胞、成骨细胞等多种途径来促进 RA 病程中的炎症和骨破坏发生 [10]。

2 AhR 与 T 细胞

T 细胞是机体特异性的重要组成部分，在 RA 的疾病进程中起重要作用。由于配体特异性等原因，不同配体激活 AhR 对 T 细胞的影响存在差异 [11]。总的来说，在 T 细胞中 AhR 的持续激活将导致类似免疫抑制的效果。

2.1 Th1/Th2 细胞

Th1 和 Th2 细胞均属于 $CD4^+$ T 细胞亚群，参与自身免疫性疾病的发展。其中 Th1 细胞介导细胞免疫，诱导促炎性细胞因子干扰素 γ（IFN-γ）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）等产生，可导致软骨破坏和骨侵蚀 [12]。Th2 细胞则主要介导体液免疫，并抑制炎症 [13]。Th1 和 Th2 细胞之间的平衡在免疫反应中起关键作用。Th1/Th2 细胞的失衡被认为是自身免疫性疾病的发病机制之一，在胶原诱导关节炎（CIA）小鼠模型中观察到了 Th1 和 Th2 细胞的失衡 [14]。AhR 可以影响 Th1/Th2 细胞的分化与功能。在诱导过敏性哮喘小鼠模型中，内源性 AhR 配体吲哚醇 -3- 硫酸盐（I3S）可以抑制 Th2 细胞的分化，使平衡向 Th1 倾斜，加重炎症反应 [15]。Nakahama 等 [16] 发现 AhR 的缺失可以阻断小鼠 CIA 模型的发展，证明 AhR 的存在有助于 Th1 细胞的产生。Kato[17] 发现外源性 AhR 配体 M50367 可以抑制 GATA-3 在幼稚 T 细胞中的表达，进而使 Th1/Th2 平衡向 Th1 优势倾斜，同时抑制 Th2 型细胞因子的产生。尽管也有 TCDD 介导 Th1 细胞因子分泌减少的报道，但在 RA 发病过程中 AhR 激活的效应主要表现为 Th1 细胞在平衡中的优势，呈现促炎作用。

2.2 Th17 细胞

Th17 细胞是 $CD4^+$ 细胞中相对较晚发现的亚群。孤儿核受体 γt（ROR-γt）是 Th17 细胞表面表达的标志性转录因子，在防御真菌与细菌感染中起关键作用，同时参与自身免疫性疾病的过程 [18]。Th17 细胞分泌白细胞介素（IL）-17A、IL-22 等促炎性细胞因子，并通过与滑膜成纤维细胞的相互作用，诱导基质金属蛋白酶表达，促进 RA 的病程 [19]。这一致病功能在小鼠的关节炎模型中也有发现。

与幼稚 T 细胞相比，AhR 在 Th17 细胞中的表达有所增加。AhR 介导了空气污染物对 Th17 细胞的分化诱导，外源性多环芳烃可以通过激活 AhR，诱导 Th17 细胞的分化，并增强分化后的 Th17 细胞产生促炎性细胞因子的能力 [20]。Kimura 等 [21] 发现在幼稚 T 细胞分化过程中，AhR 的缺失使得 Th17 细胞分化受阻，IL-17 的分泌急剧减少。上述证据证实了 AhR 对 Th17 细胞分化与功能的重要作用，AhR 通路的受损可能会减少自身免疫中的炎症反应，通过在初始 T 细胞上靶向 AhR 抑制 Th17 细胞的分化以控制 RA。

2.3 调节性 T 细胞（Treg）细胞

Treg 是一种免疫抑制性 T 细胞，可以通过 CD25 高表达和叉头状转录因子 P3（FoxP3）的表达进行区分。Treg 细胞可以分泌 IL-10 家族的抗炎细胞因子，抑制自身免疫性疾病的发展。Treg 细胞和 Th17 细胞的平衡对正常免疫反应至关重要。相关研究表明，Treg 细胞在 RA 患者与 CIA 模型动物体内显著减少 [22]。AhR 对 Treg 细胞的产生和功能维持是必要的。*AhR* 基因敲除小鼠体

内幼稚 T 细胞的 FoxP3 表达受到抑制，且 TCDD 或者 FICZ 均可以增强转化生长因子 β（TGF-β）对 FoxP3 表达的诱导 [23]，提示 AhR 可能直接参与了 FoxP3 表达的调控。Ehrlich 等 [11] 则进一步证实，不同配体对 Treg 的诱导效果表现为剂量和时间依赖性，强且持续的 AhR 激活是 Treg 细胞诱导的关键。此外，TCDD 给药也可以增强 Treg 细胞的增殖。Cui 等 [24] 发现在小鼠实验性结肠炎模型中，FICZ 可以增强 Treg 细胞分化，通过平衡 Th17/Treg 细胞来抑制免疫应答，改善自身免疫性疾病的发展。这些研究表明 AhR 在 Treg 细胞激活和增殖中的重要作用，并为通过激活 AhR 减轻 T 细胞介导的特异性免疫反应提供了思路。

AhR 对 Treg 细胞分化增殖以及 Th17/Treg 细胞平衡的调控可能是通过多条通路实现的，如肝脏激酶 b1（Lkb1）-AMP 依赖蛋白激酶（AMPK）通路 [25]、JAK/STAT 通路 [26]、吲哚 -2，3 双加氧酶（IDO）-Kyn 通 路 [27] 等。Zhang 等 [25] 发 现，AhR 可以通过促进 Skp63 的转录，加速 Lkb1 的泛素化，激活 AMPK 信号通路并对脂肪酸氧化途径进行活化。由于 Treg 细胞的能量供给与其他 T 效应细胞有所不同，这一活化将促进 Treg 细胞的生成。IDO-Kyn-AhR 通路也是 AhR 实现 T 细胞调节的重要途径：一方面，IDO 为 AhR 启动转录的下游效应分子，另一方面，IDO 参与色氨酸代谢产生的 Kyn 是 AhR 的内源性底物。Campesato 等 [27] 证明，AhR 与 Kyn 的相互作用是介导 Treg 细胞分化和免疫抑制的关键。上述证据表明，AhR 对 T 细胞平衡的调控是多途径、多效应的，不同效应之间可能存在关联。

3 AhR 与树突状细胞

树突状细胞（DCs）是特化的抗原呈递细胞，是先天性免疫和获得性免疫之间的桥梁。DCs 可以促进幼稚 T 细胞向效应 T 细胞的分化，激活 $CD8^+$ T 细胞，促进 B 细胞的抗体反应，因而可能参与了 RA 早期针对特异性抗原的免疫反应。在 RA 患者的关节腔和关节滑膜组织中，DCs 的数量明显增加 [28]。

AhR 介导环境污染物对 RA 的诱发作用，环境中的多环芳烃可以通过 AhR 促进 DCs 的分化与成熟。同时，AhR 具有诱导调节性 DCs 的能力，调节性 DCs 可以增加下游 IDO 的表达，并通过参与色氨酸代谢，发挥免疫抑制作用。在机体内这一效应与 AhR 的促炎效果相互抵消，整体表现出免疫调节的平衡状态。在 RA 患者体内可能存在平衡的打破，表现为 AhR 对 DCs 促炎表征的诱导。

4 AhR 与间充质干细胞

间充质干细胞（MSCs）是一类异质细胞群，可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等。MSCs 参与了炎症抑制、血管生成、基质金属蛋白酶分泌抑制等过程 [29]。在炎症过程中，MSCs 可以诱导巨噬细胞从促炎性的 M1 型向抗炎性的 M2 型转变。

AhR 在 MSCs 中表达丰富，有报道称 AhR 可以抑制 MSCs 的增殖 [30]。相应的，AhR 拮抗剂 SR1 可以以剂量和时间依赖的方式刺激人骨髓 MSCs 的增殖 [31]。拮抗剂 CH223191 则在诱导哮喘模型中增加了 M2 型巨噬细胞的极化，对 MSCs 外泌体的分泌也有影响 [32]，这表明 AhR 激活影响了 MSCs 的增殖与功能，发挥促炎作用。

5 AhR 与破骨细胞和成骨细胞

成骨细胞来源于 MSCs，其分化受骨形态发生蛋白（BMP）和 Wnt 通路的调节，可以产生并维持骨结构。而破骨细胞来源于普通髓系祖细胞，受核因子 κB 配体受体激活剂（RANKL）和巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）的诱导表达，是体内唯一具有溶解骨组织能力的细胞。骨骼稳态和骨重塑受到成骨细胞和破骨细胞平衡的调节，两者相互影响 [33]。RA 患者普遍存在局部破骨细胞的过度活化和成骨细胞的分化降低，导致关节周围的骨破坏。

在成骨细胞和破骨细胞胞质中，AhR 均有表达。有研究表明，TCDD 等环境污染物可以通过激活 AhR 阻碍 MSCs 分化为成骨细胞 [34]。同时，环境污染物如烟草烟雾中包含的 BaP、TCDD 等 AhR 激动剂，可以通过激活 AhR 下游细胞色素 P450 1a（Cyp1a）的表达，诱导破骨细胞生成和骨吸收增加 [35]。这可能是环境因素影响 RA 的原因之一。然而，令人意外的是，许多内源性和外源性的 AhR 配体在实验中诱导了成骨细胞的分化，改善了骨破坏的情况。如人参皂苷 Rb_1 通过 AhR/PRELP/NF-κB 轴增强成骨细胞分化 [36]，TCDD 通过激活 AhR 诱导了成骨细胞，使小鼠的骨髓脂质减少 [37]，这可能与 AhR 是发挥整体效果还是局部效果有关。尽管也有证据支持激活 AhR 的破骨作用，但就治疗目的而言，AhR 的激动诱导了破骨效应的抑制。一些具有临床应用价值的配体可以通过 AhR 与下游的相关通路，改善 RA 中的骨破坏。

6 基于 AhR 靶点的药物

AhR 介导的免疫机制有助于从分子水平上进

一步认识 RA 等自身免疫性疾病，对不同种类细胞的影响效果总结见图 2。综上所述，AhR 或许是 RA 治疗的新的靶点。由于配体特异性等原因，AhR 激活对特定细胞群的作用可能并不一致，这就需要寻找不良反应少或具有临床意义的配体作为潜在药物。

AhR 激动后的免疫抑制效果已被证实。在实验室阶段，分离自中药粉防己的 Tetrandrine[38] 和乌药的 Norisoboldine[39] 等成分被证实可激动 AhR，缓解 RA 症状。其中，Tetrandrine 作为 AhR 激动剂，促进 Treg 细胞分化并且重塑 Th17/Treg 细胞平衡，改善关节炎严重程度。Norisoboldine 则抑制了 NF-κB 的核易位，通过抑制破骨细胞分化改善骨侵蚀。Flegel 等 [40] 基于小檗碱骨架合成的 AhR 激动剂 Picoberin 在体外实验中表现出诱导成骨细胞分化的效果。这表明了传统中药活性成分在治疗 RA 方面的巨大潜力。部分具有 AhR 激动活性的潜在药物及其作用机制的归纳见表 1。

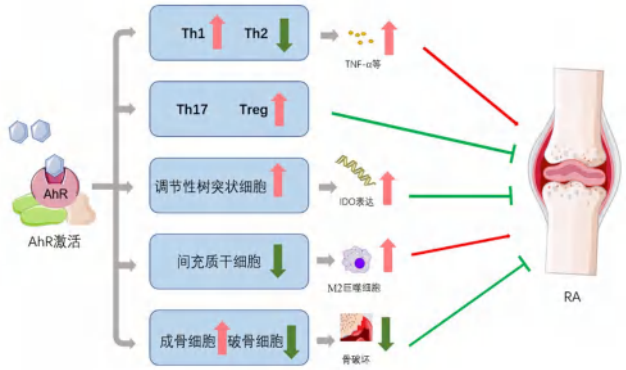


图 2 AhR 激活后对不同细胞的影响效应及对 RA 的影响

Fig 2 Effect of AhR activation on different cells and RA

表 1 以激活 AhR 方式改善 RA 的不同化合物及其实验对象与机制

Tab 1 Experimental subjects and mechanisms of different compounds treated RA by activing AHR

化合物	研究对象	作用机制
indole-3-aldehyde[26]	大鼠软骨细胞	抑制 NF-κB 途径
L-Kyn[27]	小鼠	促进 Treg 细胞分化
tetrandrine[38]	小鼠 CIA 模型	促进 Cyp1A1 表达，促进 Treg 细胞分化
norisoboldine[39]	RAW264.7 细胞、大鼠 CIA 模型	抑制 NF-κB 核易位，抑制破骨细胞分化
picoberin[40]	C3H10T1/2 细胞	促进成骨细胞分化
FICZ[41]	小鼠	减少 RANKL 介导的破骨细胞分化
artesunate[42]	大鼠 CIA 模型	激活 AhR/ARNT/NQO1 信号通路抑制破骨细胞分化

同时，AhR 的过度激活也是 RA 发病的因素之一。部分 AhR 的抑制剂或拮抗剂亦可能发挥抗 RA 效果。Zhang 等 [43] 发现芍药苷的酯衍生物 CP-25 可以抑制 AhR 表达，改善滑膜成纤维细胞功能障碍，改善关节炎模型动物的症状。Shi 等 [44] 发现分离自肉桂的多酚类化合物 CTD-1 可以显著改善小鼠关节炎模型的严重程度。上述抑制剂主要影响 AhR 表达，避免配体的不良刺激。

除小分子和天然活性成分外，以人脐间充质干细胞（HUMSC）为代表的生物疗法也具有抗 RA 的潜力。Li 等 [45] 发现 HUMSC 可以通过 AhR 调节免疫和肠道微生物群间的相互作用，缓解 CIA 大鼠的病情。

最近，AhR 激动剂 Tapinarof 被批准用于治疗斑块状银屑病，其作用机制是通过 AhR 的激活影响外周 $CD4^+$ T 细胞分化和炎症因子的表达 [46]。鉴于这一研究进展，基于 AhR 靶点的药物有望成为未来 RA 治疗的新方向。

7 总结

RA 是机制复杂的慢性自身免疫性疾病，AhR 在其中的作用需要更加系统的研究来阐述。在不同的研究中 AhR 的效应不同甚至相反，这可能与配体特异性有关，但也可能与在不同细胞和疾病不同阶段的 AhR 激活产生作用的差异有关，例如，在幼稚 T 细胞和 Treg 细胞中，激活 AhR 的效应并不完全相同。这需要更多的实验来研究不同细胞种群中 AhR 的作用差异，而非全身性 AhR 激动或抑制的效应。

当前 RA 的临床治疗多依赖副作用严重的非甾体抗炎药（NSAIDs）和改善病情抗风湿药（DMARDs），而 AhR 可以通过多种途径对 RA 的进展产生影响，可能是未来 RA 药物开发的重要靶点。考虑到 AhR 激活后的免疫抑制能力是更普遍、更总体的效应，通过激动 T 细胞等免疫细胞中的 AhR 来减轻 RA 的症状可能具有良好的前景。现有实验中的 AhR 激动剂大多是天然产物，特异性较差，基于天然产物进行结构优化或设计小分子激动剂将改善这一问题。此外，由于 AhR 的配体特异性和广泛的表达，如何提高药物的靶向性，避免全身性反应和严重副作用也是需要注意的问题。

参考文献

[1] Finckh A，Gilbert B，Hodkinson B，et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol，2022，18（10）：591-602.

[2] Lu DR，McDavid AN，Kongpachith S，et al. T cell-dependent affinity maturation and innate immune pathways differentially drive autoreactive B cell responses in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol，2018，70（11）：1732-1744.

[3] Swedenborg E，Pongratz I. AhR and ARNT modulate ER signaling [J]. Toxicology，2010，268（3）：132-138.

[4] Wheeler MA，Rothhammer V，Quintana FJ. Control of immune-mediated pathology via the aryl hydrocarbon receptor [J]. J Biol Chem，2017，292（30）：12383-12389.

[5] Gruszczyk J，Grandvuillemin L，Lai-Kee-Him J，et al. Cryo-EM structure of the agonist-bound Hsp90-XAP2-AHR cytosolic complex [J]. Nat Commun，2022，13（1）：7010.

[6] Carambia A，Schuran FA. The aryl hydrocarbon receptor in liver inflammation [J]. Semin Immunopathol，2021，43（4）：563-575.

[7] Zhu K，Meng Q，Zhang Z，et al. Aryl hydrocarbon receptor pathway：role，regulation and intervention in atherosclerosis therapy（review）[J]. Mol Med Rep，2019，20（6）：4763-4773.

[8] Ikuta T，Tachibana T，Watanabe J，et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor [J]. J Biochem，2000，127（3）：503-509.

[9] Izawa T，Arakaki R，Mori H，et al. The nuclear receptor ahR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis [J]. J Immunol，2016，197（12）：4639-4650.

[10] Kazantseva MG，Highton J，Stamp LK，et al. Dendritic cells provide a potential link between smoking and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther，2012，14（5）：R208.

[11] Ehrlich AK，Pennington JM，Bisson WH，et al. TCDD，FICZ，and other high affinity AhR ligands dose-dependently determine the fate of $CD4^+$ T cell differentiation [J]. Toxicol Sci，2018，161（2）：310-320.

[12] Luo P，Wang P，Xu J，et al. Immunomodulatory role of T helper cells in rheumatoid arthritis：a comprehensive research review [J]. Bone Joint Res，2022，11（7）：426-438.

[13] Miossec P，Chomarat P，Dechanet J，et al. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum，1994，37（12）：1715-1722.

[14] Zwerina J，Hayer S，Tohidast-Akrad M，et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor，interleukin-1，and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis：effects on synovial inflammation，bone erosion，and cartilage destruction [J]. Arthritis Rheum，2004，50（1）：277-290.

[15] Hwang YJ，Yun MO，Jeong KT，et al. Uremic toxin indoxyl 3-sulfate regulates the differentiation of Th2 but not of Th1 cells to lessen allergic asthma [J]. Toxicol Lett，2014，225（1）：130-138.

[16] Nakahama T，Kimura A，Nguyen NT，et al. Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2011，108（34）：14222-14227.

[17] Kato Y，Manabe T，Tanaka Y，et al. Effect of an orally active Th1/Th2 balance modulator，M50367，on IgE production，eosinophilia，and airway hyperresponsiveness in mice [J]. J Immunol，1999，162（12）：7470-7479.

[18] Korn T，Bettelli E，Oukka M，et al. IL-17 and Th17 Cells [J]. Annu Rev Immunol，2009，27：485-517.

[19] van Hamburg JP，Asmawidjaja PS，Davelaar N，et al. Th17 cells，but not Th1 cells，from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction，including autocrine interleukin-17A production [J]. Arthritis Rheum，2011，63（1）：73-83.

[20] Veldhoen M，Hirota K，Westendorf AM，et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins [J]. Nature，2008，453（7191）：106-109.

[21] Kimura A，Naka T，Nohara K，et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2008，105（28）：9721-9726.

[22] Atkinson SM，Hoffmann U，Hamann A，et al. Depletion of regulatory T cells leads to an exacerbation of delayed-type hypersensitivity arthritis in C57BL/6 mice that can be counteracted by IL-17 blockade [J]. Dis Model Mech，2016，9（4）：427-440.

[23] Quintana FJ，Basso AS，Iglesias AH，et al. Control of T（reg）and T（H）17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor [J]. Nature，2008，453（7191）：65-71.

[24] Cui XF，Ye ZP，Wang D，et al. Aryl hydrocarbon receptor activation ameliorates experimental colitis by modulating the tolerogenic dendritic and regulatory T cell formation [J]. Cell Biosci，2022，12（1）：46.

[25] Zhang Q，Zhu YR，Lv CJ，et al. AhR activation promotes Treg cell generation by enhancing Lkb1-mediated fatty acid oxidation via the Skp2/K63-ubiquitination pathway [J]. Immunology，2023，doi：10.1111/imm.13638.

[26] Zhuang HM，Li B，Xie T，et al. Indole-3-aldehyde alleviates chondrocytes inflammation through the AhR-NF-kappaB signalling pathway [J]. Int Immunopharmacol，2022，113（Pt A）：109314.

[27] Campesato LF，Budhu S，Tchaicha J，et al. Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-kynurenine [J]. Nat Commun，2020，11（1）：

4011.
[28] Wehr P，Purvis H，Law SC，et al. Dendritic cells，T cells and their interaction in rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Immunol，2019，196（1）：12-27.
[29] Gerami MH，Khorram R，Rasoolzadegan S，et al. Emerging role of mesenchymal stem/stromal cells（MSCs）and MSCs-derived exosomes in bone- and joint-associated musculoskeletal disorders：a new frontier [J]. Eur J Med Res，2023，28（1）：86.
[30] Huang J，Wang YN，Zhou Y. Beneficial roles of the AhR ligand FICZ on the regenerative potentials of BMSCs and primed cartilage templates [J]. RSC Adv，2022，12（18）：11505-11516.
[31] Jia Y，Zhao YS，Zhang Z，et al. aryl hydrocarbon receptor signaling pathway plays important roles in the proliferative and metabolic properties of bone marrow mesenchymal stromal cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin（Shanghai），2021，53（11）：1428-1439.
[32] Cui Z，Feng Y，Li DQ，et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor（AhR）in mesenchymal stem cells modulates macrophage polarization in asthma [J]. J Immunotoxicol，2020，17（1）：21-30.
[33] Niu Q，Gao JF，Wang L，et al. Regulation of differentiation and generation of osteoclasts in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol，2022，13：1034050.
[34] Watson A，Nordberg RC，Loboa EG，et al. Evidence for aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells [J]. Toxicol Sci，2019，167（1）：145-156.
[35] Iqbal J，Sun L，Cao J，et al. Smoke carcinogens cause bone loss through the aryl hydrocarbon receptor and induction of Cyp1 enzymes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2013，110（27）：11115-11120.
[36] Zhang D，Du J，Yu M，et al. Ginsenoside Rb1 prevents osteoporosis via the AHR/PRELP/NF-kappaB signaling axis [J]. Phytomedicine，2022，104：154205.
[37] Fader KA，Nault R，Raehtz S，et al. 2，3，7，8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin dose-dependently increases bone mass and decreases marrow adiposity in juvenile mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2018，348：85-98.
[38] Yuan XS，Tong B，Dou YN，et al. Tetrandrine ameliorates collagen-induced arthritis in mice by restoring the balance between Th17 and Treg cells via the aryl hydrocarbon receptor [J]. Biochem Pharmacol，2016，101：87-99.
[39] Wei ZF，Lv Q，Xia Y，et al. Norisoboldine，an anti-arthritis alkaloid isolated from radix linderae，attenuates osteoclast differentiation and inflammatory bone erosion in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner [J]. Int J Biol Sci，2015，11（9）：1113-1126.
[40] Flegel J，Shaaban S，Jia ZJ，et al. The highly potent AhR agonist picoberin modulates Hh-dependent osteoblast differentiation [J]. J Med Chem，2022，65（24）：16268-16289.
[41] Yoshikawa Y，Izawa T，Hamada Y，et al. Roles for B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via the AhR/Cyp1a1 signaling axis [J]. Sci Rep，2021，11（1）：14927.
[42] Wang Q，Guo WY，Liu LL，et al. Inhibitory effect of artesunate on bone destruction in rheumatoid arthritis：an exploration based on AhR/ARNT/NQO1 signaling pathway [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi，2022，47（10）：2698-2704.
[43] Zhang BJ，Wang YY，Jia CY，et al. Paeoniflorin-6'-*O*-benzene sulfonate ameliorates the progression of adjuvant-induced arthritis by inhibiting the interaction between Ahr and GRK2 of fibroblast-like synoviocytes [J]. Int Immunopharmacol，2022，108：108678.
[44] Shi CC，Zhang HY，Wang XY，et al. Cinnamtannin D1 attenuates autoimmune arthritis by regulating the balance of Th17 and treg cells through inhibition of aryl hydrocarbon receptor expression [J]. Pharmacol Res，2020，151：104513.
[45] Li XY，Lu C，Fan DP，et al. Human umbilical mesenchymal stem cells display therapeutic potential in rheumatoid arthritis by regulating interactions between immunity and gut microbiota via the aryl hydrocarbon receptor [J]. Front Cell Dev Biol，2020，8：131.
[46] Jett JE，McLaughlin M，Lee MS，et al. Tapinar of cream 1% for extensive plaque psoriasis：a maximal use trial on safety，tolerability，and pharmacokinetics [J]. Am J Clin Dermatol，2022，23（1）：83-91.

（收稿日期：2023-02-28；修回日期：2023-05-12）

EGFR-TKI 与免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌中序贯使用引起毒副反应的研究进展

翟婧，严婷，伍奕，陈珊珊*，廖德华*（湖南省肿瘤医院/中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院，长沙　410031）

摘要：近年来，免疫检查点抑制剂（ICIs）取得了突破性进展，在非小细胞肺癌（NSCLC）的治疗中发挥了重要作用。对于某些免疫应答较强的患者，ICIs 常常能取得长期获益。而多项研究显示，表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKI）与 ICIs 序贯使用可能导致毒副反应发生率增加。本文综述了 EGFR-TKI 与 ICIs 序贯使用的最新研究进展，重点探讨其不良反应的发生情况，以期为 EGFR-TKI 及 ICIs 的安全合理使用提供参考。

关键词：非小细胞肺癌；EGFR-TKI；免疫检查点抑制剂；序贯使用；不良反应
中图分类号：R734.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1865-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.028

Research progress in the toxicity induced by sequential use of EGFR-TKI and ICIs in non-small cell lung cancer

ZHAI Jing, YAN Ting, WU Yi, CHEN Shan-shan*, LIAO De-hua* (*Hunan Cancer Hospital*, *The Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine*, *Central South University*, *Changsha* 410031)

Abstract: In recent years, breakthrough has been made in immune checkpoint inhibitors (ICIs), which play an important role in the treatment of NSCLC. ICIs often have long-term benefits for patients with stronger immune responses. Recent studies have shown that the sequential use of EGFR-TKI and ICIs may lead to an increased incidence of toxic effects. This review elaborated the latest research progress in the sequential use of EGFR-TKI and ICIs, focusing on the occurrence of adverse reactions, and providing reference for the safe and rational use of EGFR-TKI and ICIs.

Key words: non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor; immune checkpoint inhibitor; sequential use; adverse reaction

肺癌是目前世界上死亡率最高的恶性肿瘤[1]，非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）在病理类型中占所有肺癌的 85%。伴随着肿瘤分子生物学的研究进展，一系列小分子酪氨酸激酶抑制剂（TKI）类药物成功研发并用于临床[2]，其中，表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKI）对于 EGFR 敏感突变的 NSCLC 患者具有很好的肿瘤抑制作用，但同时患者在使用 TKI 类药物时均会不可避免地出现耐药现象[3-6]。随着肿瘤免疫微环境的研究进展，免疫治疗为肿瘤治疗带来了新突破，这种利用抗体阻断程序性死亡 - 配体 1（PD-L1）与程序性死亡受体 1（PD-1）的相互作用，从而恢复或激活抗肿瘤免疫反应的疗法，为肿瘤治疗带来了希望[7]。既往Ⅲ期临床研究（RATIONALE 304、IMpower 130、KEYNOTE-407、KEYNOTE-024、KEYNOTE-042 等）显示，在晚期 NSCLC 中，免疫检查点抑制剂（ICIs）比传统化疗具有更好的疗效和更低的毒性[8]，为晚期 NSCLC 患者提供了新的治疗策略，特别是那些驱动基因突变阴性的患者[9]。自第一个抗 PD-L1 受体药物纳武利尤单抗在 2015 年经 FDA 获批后，大量的 ICIs 已

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ70025）；湖南省医学会临床药学分会基金项目（No.HMA202001005）；湖南省药学会基金项目（No.2020YXH001）；湖南省肿瘤医院攀登基金项目（No.2021NSFC-A003）。

作者简介：翟婧，女，药师，主要从事肿瘤个体化给药及毒副反应防治研究，email：1982221385@qq.com　*通信作者：陈珊珊，女，硕士，主管药师，主要从事抗肿瘤药物微环境研究，email：chenshanshan@hnca.org.cn；廖德华，男，博士，副主任药师，主要从事新型抗肿瘤药物的个体化应用方面的研究，email：liaodehua1125@126.com

被批准用于晚期 NSCLC 的一线和二线治疗。与传统化疗相比，无论是单药治疗还是联合标准化疗，ICIs 均可提高生存率，但与免疫治疗相关的不良反应 [10-12] 仍会影响患者的生活质量。

此外，研究发现部分 EGFR 突变的 NSCLC 患者在使用 TKI 耐药后出现 PD-L1 表达升高的现象 [13-15]，EGFR 敏感突变总是伴随着 PD-L1 过表达，诱导 T 细胞调亡，促进免疫逃逸。EGFR-TKI 耐药进展后，NSCLC 患者常常会接受含 ICIs 方案的序贯治疗，且在临床实践中，往往会先使用短期的免疫治疗或免疫化疗作为紧急治疗来控制疾病进展，待基因检测结果出来后发现有 EGFR 突变的再换成适宜的 EGFR-TKI 类靶向药物。但大量报道显示 EGFR-TKI 与 ICIs 序贯使用时 NSCLC 患者的毒副反应发生率明显上升，某些严重的毒副反应甚至导致治疗中断，临床用药受到限制 [16-18]，本文就 NSCLC 中 EGFR-TKI 与 ICIs 序贯使用的最新研究进展展开综述，重点探讨其不良反应，以期为 EGFR-TKI 及 ICIs 的安全合理用药提供参考。以 EGFR-TKI 与 ICIs（包括两类药物所有药物通用名）为关键词通过中国生物医学文献数据库（CBM）、美国 PubMed 数据库及熊猫学术数据库，检索 2003 年 1 月 —2022 年 11 月有关 NSCLC 中 EGFR-TKI 与 ICIs 序贯使用的文献进行分析。

1 EGFR-TKI 类药物序贯使用 ICIs

1.1 一代 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs

大量研究显示，一代 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs 不会导致毒副反应发生率增加，但也有回顾性分析显示结果完全相反。Uchida 等 [19] 回顾性分析了 26 例患者序贯使用 EGFR-TKI 与纳武利尤单抗后与间质性肺炎（interstitial lung disease，ILD）发生的相关性，1 例先使用吉非替尼与 4 例先使用厄洛替尼后序贯使用纳武利尤单抗的患者均未发生 ILD，1 例先使用厄洛替尼后序贯使用帕博利珠单抗的患者也未发生 ILD。Ito 等 [20] 纳入了 25 例既往经 EGFR-TKIs 治疗后接受 ICIs 单药治疗的 EGFR 突变的 NSCLC 患者，回顾性分析了在 EGFR-TKIs 治疗后接受 ICIs 治疗的 EGFR 基因突变阳性肺癌患者的疗效，结果客观缓解率（objective response rate，ORR）为 20%，疾病控制率（disease control rate，DCR）为 36%。比较 EGFR 亚型突变，外显子 19 缺失和 L858R 的 ORR 分别为 9.1% 和 30.0%，DCR 分别为 27.3% 和 50.0%，表明 ICIs 对 L858R 肿瘤有较高的抗肿瘤作用。此外，ICIs 对 PD-L1 阳性和 PD-L1 阴性患者的有效率分别为 22.2% 和 12.5%，但差异无统计学意义；非吸烟者与吸烟者的 ORR 分别为 22.1% 和 16.6%，DCR 分别为 38.5% 和 33.3%。25 例患者中 13 例经吉非替尼治疗和 7 例经厄洛替尼治疗后序贯使用 ICIs 的患者并未发生严重不良反应。Schoenfeld 等 [21] 纳入了 126 例接受 ICIs 与 EGFR-TKI 序贯治疗的 EGFR 突变的 NSCLC 患者，2 例吉非替尼和 84 例厄洛替尼后序贯 ICIs 的患者均未发生严重毒副反应。Kato 等 [22] 对 155 例既往经 EGFR-TKIs 或化疗失败后继续接受免疫治疗（CTLA-4，PD-1/PD-L1 抑制剂或其他药物）并通过二代测序评估其肿瘤为Ⅳ期的癌症患者进行分析，其中 10 例 EGFR 突变的患者中有 2 例在使用纳武利尤单抗后出现了较大的疾病进展，2 个月内肿瘤分别增加 53.6% 和 125%。也有研究显示 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs 毒副反应发生率更高，如 Baroz 等 [23] 回顾评估纳入了 63 例 TKI 与 ICIs 序贯使用的 NSCLC 患者，23 例患者发生毒副反应，分别为 5 例肺炎、4 例腹泻、3 例疲劳和 3 例皮疹 / 瘙痒，2 例关节痛及肌痛、1 例新发糖尿病和 1 例肾功能不全，其中 22 例患者在接受 ICIs 治疗前接受 TKI 治疗，不良反应发生率为 34.9%（22/63）。

1.2 二代 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs

研究表明，二代 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs 并未导致严重毒副反应发生率增加。Uchida 等 [19] 回顾性分析 26 例患者中，9 例既往使用阿法替尼治疗的患者后序贯纳武利尤单抗期间未出现 ILD，其中有 1 例患者在阿法替尼治疗期间出现 ILD，停药经类固醇治疗后好转，后续纳武利尤单抗治疗期间未再次发生 ILD。Ito 等 [20] 回顾性研究中 25 例患者在 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs（包括 21 例纳武利尤单抗、2 例阿替利珠单抗、2 例帕博利珠单抗），共有 8 例发生毒副反应，21 例序贯使用纳武利尤单抗的患者中出现了 3 例甲状腺功能减退、2 例疲劳、1 例血钾升高、1 例皮疹，2 例序贯帕博利珠单抗的患者中出现了 1 例意识水平低下。但这些毒副反应都未超过 2 级，且无需住院治疗，并未影响后期治疗；11 例经阿法替尼治疗后序贯使用 ICIs 的患者并未观察到 3 级及以上毒副反应。Schoenfeld 等 [21] 回顾性分析了 16 例阿法替尼后序贯使用 ICIs 的 NSCLC 患者也未发生严重毒副反应。

1.3 三代 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs

研究发现，三代 EGFR-TKI 后序贯使用 ICIs 也不会导致毒副反应发生率增加。Uchida 等 [19] 对比在纳武利尤单抗前后立即给予第三代 EGFR-TKI 相关的 ILD 发生率，26 例患者中 6 例奥希替尼后使用 ICIs 未发生 ILD，认为即使在使用了奥希替尼后立即使用 ICIs 也不会导致 ILD 发生率上升，即使发生 ILD 也与奥希替尼无关。Ito 等 [20] 回顾性

研究中 5 例经奥希替尼治疗疾病进展后序贯使用 ICIs 的患者并未观察到 3 级以上毒副反应，且未发生 ILD。Schoenfeld 等 [21] 的研究中，29 例患者在接受奥希替尼治疗后序贯使用 ICIs（包括 16 例纳武利尤单抗，10 例帕博利珠单抗，3 例阿替利珠单抗）治疗，均未观察到严重毒副反应。

2 ICIs 类药物后序贯使用 EGFR-TKI

2.1 ICIs 后序贯使用一代 EGFR-TKI

研究发现，ICIs 后序贯使用一代 EGFR-TKI 未导致毒副反应发生率增加。Uchida 等 [19] 的研究中，在 ICIs 后序贯使用吉非替尼的 1 例患者以及序贯使用厄洛替尼的 2 例患者均未出现 ILD。Schoenfeld 等 [21] 研究了 ICIs 序贯使用厄洛替尼治疗的 20 例患者，在接受厄洛替尼治疗时没有发生严重的不良事件，从最后一次服用 ICIs 到开始服用厄洛替尼的中位时间间隔为 19 d，其中 1 例患者因 3 级结肠炎而停用德瓦鲁单抗和曲美木单抗，症状缓解 3 个月后接受厄洛替尼治疗，没有发生新的或复发的免疫相关毒性。

2.2 ICIs 后二代序贯使用 EGFR-TKI

研究表明，ICIs 后序贯使用二代 EGFR-TKI 也未导致毒副反应发生率增加。Uchida 等 [19] 研究发现，经纳武利尤单抗后序贯使用阿法替尼的 2 例患者未出现 ILD，认为在纳武利尤单抗后短时间内序贯使用一代或二代 EGFR-TKI 不会导致 ILD 的发生风险增加。Schoenfeld 等 [21] 的研究中，先 ICIs 后序贯使用阿法替尼治疗的 7 例患者没有发生严重的不良反应，ICIs 最后一次使用至阿法替尼开始治疗的中位时间间隔为 57 d。SPACE 是一项正在进行的阿法替尼治疗晚期鳞状细胞肺癌在铂基双重化疗和免疫治疗后进展的疗效和安全性的研究，目前暂无相关研究结果 [24]。

2.3 ICIs 后序贯使用三代 EGFR-TKI

近期研究显示，ICIs 后序贯使用三代 EGFR-TKI 导致毒副反应发生率明显增加，这可能与第一、二 TKIs 和三代之间的 ILD 发生机制不同。NSCLC 患者在 ICIs 之后序贯使用三代 EGFR-TKI 治疗导致严重毒副反应的发生率明显升高。Uchida 等 [19] 的研究中，7 例患者先 ICIs 后奥希替尼，其中 4 例患者 ICIs 治疗后序贯使用 EGFR-TKI 治疗发生 ILD，3 例为使用 ICIs 之后立刻使用奥希替尼发生 ILD，因此推测一、二代 EGFR-TKI 与奥希替尼导致 ILD 发生机制不同，虽然详细的机制尚不清楚，但 ICIs 激活的 T 细胞效应可能协同上调这种效应，导致患者在 ICIs 之后立即使用奥希替尼易发生 ILD。Schoenfeld 等 [21] 的研究中，41 例患者接受序贯 ICIs 治疗后给予奥希替尼，包括 24 例纳武利尤单抗，9 例帕博利珠单抗，8 例阿替利珠单抗，其中 6 例患者发生了严重的不良事件，包括 4 例 3 级肺炎、1 例 3 级结肠炎和 1 例 4 级肝炎，ICIs 治疗后序贯使用奥希替尼的毒副反应发生率（15%，6/41）远高于单药奥希替尼（4%）以及 ICIs（3%）。1 例患者在肝炎消退 18 d 后重新开始服用全剂量的奥希替尼，12 d 后又复发 3 级肝炎；另外 2 例患者则是在初始的不良反应恢复后 70 d 和 79 d 重新开始服用全剂量的奥希替尼，均未出现复发毒性；此外，在奥希替尼停用后接受其他 TKIs（厄洛替尼和阿法替尼）的 2 例患者没有出现加重或复发的毒副反应。Oshima 等 [25] 的回顾性研究中，70 例患者均使用了纳武利尤单抗与 EGFR-TKI，共 18 例患者发生了 ILD，其中 15 例患者为经纳武利尤单抗治疗后序贯奥希替尼。Kotake 等 [26] 研究亦发现，使用奥希替尼的 19 例患者 ILD 发生率为 21%（4/19），发生 ILD 的 4 例患者中有 3 例患者在纳武利尤单抗后序贯使用了奥希替尼。Yamaguchi 等 [27] 的单机构回顾性分析中，纳入了 47 例 EGFR 突变的晚期 NSCLC 患者，其中 7 例在纳武利尤单抗之后序贯使用了奥希替尼，4 例在奥希替尼使用期间发生了 3 级及以上肝毒性（57.1%，4/7）；40 例在其他药物治疗之后序贯使用奥希替尼，2 例发生了 3 级肝毒性（5.0%，2/40）。相比之下，纳武利尤单抗之后序贯奥希替尼严重肝毒性发生率远高于其他药物，上述 ICIs 前后序贯 EGFR-TKI 相关研究见表 1。

3 讨论

先 ICIs 后序贯使用三代 EGFR-TKI 更易发生毒副反应，序贯使用的毒副反应发生率也可能与序贯使用时间间隔相关，治疗的特定顺序和时间是毒副反应风险的重要决定因素。研究显示，ICIs 可与 T 细胞上的 PD-L1 受体结合时间长达 2 个月 [28]，而奥希替尼的半衰期相对较短，只有 50 h 左右 [29-30]，ICIs 的半衰期较长也可能是增加后续 EGFR-TKI 治疗时免疫相关不良事件的原因之一，Shinno 等 [31] 确定了 3 例停用纳武利尤单抗不久后再转用奥希替尼治疗期间开始发生毒副事件的 NSCLC 患者，通过液相色谱 - 质谱分析来估计这些患者血清中纳武利尤单抗的浓度，3 例患者停用纳武利尤单抗后，第 22 ～ 46 日给予奥希替尼，在第 56 ～ 96 日后出现相关毒性反应。而液相色谱 - 质谱分析显示病例 1、2 和 3 中纳武利尤单抗的剩余水平分别为 2.1、12.8、31.1 μg • mL $^{-1}$，足以诱导免疫应答。ICI 抗体在停药后仍然存在，在抗 PD-L1 抗体受体占用时间持续数月 [32-33]，因此先使用奥希替尼后序贯使用 ICIs 不会有大量的重

表 1 ICIs 前后序贯 EGFR-TKI 的安全性及有效性相关报道

Tab 1 Safety and efficacy of EGFR-TKI before and after ICIs

研究	入组患者数量	ICI 之前	ICI	ICI 之后	不良反应发生情况
Uchida 等 [19]	26 例，在 PD-1 抑制剂之前或之后立即使用 EGFR-TKIs 治疗	吉非替尼（1）、厄洛替尼（5）、阿法替尼（9）、奥希替尼（6）	纳武利尤单抗（19）、帕博利珠单抗（2）	/	/
		/	纳武利尤单抗（10）、帕博利珠单抗（2）	吉非替尼（1）、厄洛替尼（2）、阿法替尼（2）、奥希替尼（7）	ICIs 后奥希替尼中发生 ILD（4）
Ito 等 [20]	25 例，EGFR-TKIs 后接受 ICIs 单药治疗 EGFR 突变的 NSCLC	吉非替尼（13）、厄洛替尼（7）、阿法替尼（11）、奥希替尼（5）	纳武利尤单抗（21）、帕博利珠单抗（2）、阿替利珠单抗（2）	/	甲状腺功能减退（3）、疲劳（2）、血钾升高（1）、皮疹（1）、意识水平低下（1）
Kato 等 [22]	155 例，免疫治疗后的Ⅳ期癌症	EGFR-TKIs	CTLA-4，PD-1/PD-L1 抑制剂，或其他药物	/	/
Baroz 等 [23]	63 例，在 ICIs 前后使用 TKIs 治疗	TKIs	ICIs	TKIs	肺炎（5）、腹泻（4）、疲劳（3）、皮疹（3）、关节痛及肌痛（2）、糖尿病（1）、肾功能不全（1）；22 例 TKI 后 ICIs
Schoenfeld 等 [21]	126 例，用 PD-1/PD-L1 抑制剂和 EGFR-TKIs	厄洛替尼（84）、阿法替尼（16）、吉非替尼（2）、奥希替尼（29）	纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、阿替利珠单抗、德瓦鲁单抗	/	/
		/		厄洛替尼（20）、阿法替尼（7）、奥希替尼（41）	ICIs 后序贯奥希替尼发生 3 级肝炎（4），3 级结肠炎（1），4 级肝炎（1）
Oshima 等 [25]	20 516 例，NSCLC	/	纳武利尤单抗	EGFR-TKIs	18 例发生 ILD 患者中序贯奥希替尼为 15
Kotake 等 [26]	19 例，NSCLC 存在 EGFR T790M 突变	/	纳武利尤单抗	奥希替尼	ILD（4）
Yamaguchi 等 [27]	47 例，既往接受过治疗的携带 EGFR 突变的晚期 NSCLC 患者	/	纳武利尤单抗	奥希替尼（7）、其他（40）	序贯奥希替尼 3 级及以上肝毒性（4）；其他药物 3 级肝毒性（2）

叠暴露，不会导致严重毒副反应的叠加。相比之下，在使用 ICIs 后短期内使用奥希替尼严重不良事件发生率大大提高，通常一年后再使用奥希替尼也极少观察到严重不良事件发生。

EGFR 突变的晚期 NSCLC 患者选用治疗方案时，应综合考虑 TKI 治疗期间的 PFS、是否 T790M 突变、肿瘤突变负荷及 PD-L1 的表达量 [15]，同时对于短时间内接受过 ICIs 治疗，后服用三代 EGFR-TKI 类药物的患者应该密切关注相关不良反应的发生，这些毒性反应往往在接受奥希替尼治疗后立即出现，最常见的免疫相关不良事件是由于间质和肺泡浸润的发展而表现为肺炎，对于严重类固醇难治性免疫相关不良反应的适当管理策略 [34-36]，通过预先给予细胞因子导向的生物疗法，有两个主要目标：一是快速抑制炎症反应的急性期，从而限制类固醇依赖的风险；二是抑制肿瘤发展。相关不良反应改善后可考虑使用一、二代 EGFR-TKI 继续治疗。

4 结论

综上所述，EGFR-TKI 与 ICIs 序贯使用的先后顺序与毒副反应的发生率显著相关，且与不同类别的 EGFR-TKI 相关，先使用 ICIs 后序贯使用三代 EGFR-TKI 更易发生严重不良反应，且观察到短期 3 个月内毒副反应发生率显著上升。这可能与奥希替尼以及 ICIs 半衰期差异的因素相关。目前报道大多为回顾性研究，存在着样本量不够大的局限性，需要进一步调查与前瞻性研究来证实结果，且与三代 EGFR-TKI 与 ICIs 序贯使用的报道相比，一二代数据较少，序贯使用安全性及有效性还需要进一步探索。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] Pao W，Chmielecki J. Rational，biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. Nat Rev Cancer，2010，10（11）：760-774.

[3] Mok TS，Wu Y，Ahn M，et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. N Engl J Med，2017，376（7）：629-640.

[4] Yu HA，Arcila ME，Rekhtman N，et al. Analysis of tumor

specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TK I therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. Clin Cancer Res，2013，19（8）：CCR-12-2246.

[5] Wu YL，Zhou C，Liam CK，et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer：analyses from the phase Ⅲ，randomized，open-label，ENSURE study [J]. Ann Oncol，2015，26（9）：1883-1889.

[6] Soria JC，Ohe Y，Vansteenkiste J，et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：113-125.

[7] Oberndorfer F，Müllauer L. Molecular pathology of lung cancer：current status and perspectives [J]. Curr Opin Oncol，2018，30（2）：69-76.

[8] Horn L，Spigel DR，Vokes EE，et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated patients with advanced non–small-cell lung cancer：two-year outcomes from two randomized，open-label，phase Ⅲ trials（CheckMate 017 and CheckMate 057）[J]. J Clin Oncol，2017，35（35）：3924.

[9] Soo RA，Kim HR，Asuncion BR，et al. Significance of immune checkpoint proteins in EGFR-mutant non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer，2017，105：17-22.

[10] Suresh K，Naidoo J，Lin CT，et al. Immune checkpoint immunotherapy for non-small cell lung cancer：benefits and pulmonary toxicities [J]. Chest，2018，154（6）：1416-1423.

[11] Muchnik E，Loh KP，Strawderman M，et al. Immune checkpoint inhibitors in real-world treatment of older adults with non-small cell lung cancer [J]. J Am Geriatr Soc，2019，67（5）：905-912.

[12] Sławiński G，Wrona A，Dąbrowska-Kugacka A，et al. Immune checkpoint inhibitors and cardiac toxicity in patients treated for non-small lung cancer：a review [J]. Int J Mol Sci，2020，21（19）：7195.

[13] Han JJ，Kim DW，Koh J，et al. Change in PD-L1 expression after acquiring resistance to gefitinib in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. Clin Lung Cancer，2016，17（4）：263-270. e2.

[14] Peng S，Wang R，Zhang X，et al. EGFR-TKI resistance promotes immune escape in lung cancer via increased PD-L1 expression [J]. Mol Cancer，2019，18（1）：1-14.

[15] Kunimasa K，Nakamura H，Sakai K，et al. Heterogeneity of EGFR-mutant clones and PD-L1 highly expressing clones affects treatment efficacy of EGFR-TKI and PD-1 inhibitor [J]. Ann Oncol，2018，29（10）：2145-2147.

[16] Mamesaya N，Kenmotsu H，Katsumata M，et al. Osimertinib-induced interstitial lung disease after treatment with anti-PD1 antibody [J]. Invest New Drug，2017，35（1）：105-107.

[17] Takakuwa O，Oguri T，Uemura T，et al. Osimertinib induced interstitial lung disease in a patient with non small cell lung cancer pretreated with nivolumab：a case report [J]. Mol Clin Oncol，2017，7（3）：383-385.

[18] Gianni C，Bronte G，Delmonte A，et al. Case report：stevens-johnson syndrome and hepatotoxicity induced by osimertinib sequential to pembrolizumab in a patient with egfr-mutated lung adenocarcinoma [J]. Front Pharmacol，2021：2103.

[19] Uchida T，Kaira K，Yamaguchi O，et al. Different incidence of interstitial lung disease according to different kinds of EGFR-tyrosine kinase inhibitors administered immediately before and/or after anti-PD-1 antibodies in lung cancer [J]. Thorac Cancer，2019，10（4）：975-979.

[20] Ito T，Nagashima H，Akiyama M，et al. Treatment with immune checkpoint inhibitors after EGFR-TKIs in EGFR - mutated lung cancer [J]. Thorac Cancer，2022，13（3）：386-393.

[21] Schoenfeld AJ，Arbour KC，Rizvi H，et al. Severe immune-related adverse events are common with sequential PD-（L）1 blockade and osimertinib [J]. Ann Oncol，2019，30（5）：839-844.

[22] Kato S，Goodman A，Walavalkar V，et al. Hyperprogressors after immunotherapy：analysis of genomic alterations associated with accelerated growth rategenomics of immunotherapy-associated hyperprogressors [J]. Clin Cancer Res，2017，23（15）：4242-4250.

[23] Baroz AR，Mambetsariev I，Fricke J，et al. Evaluation of immune-related adverse events in patients treated with sequential immunotherapy and tyrosine kinase inhibitor treatment in non-small cell lung cancer [J]. J Clin Oncol，2020：e21562-e21562.

[24] Lee SH，Park CK，Lee SY，et al. Treatment outcomes and safety of afatinib in advanced squamous cell lung cancer progressed after platinum-based doublet chemotherapy and immunotherapy（SPACE study）[J]. Thorac Cancer，2021，12（8）：1264-1268.

[25] Oshima Y，Tanimoto T，Yuji K，et al. EGFR-TKI-associated interstitial pneumonitis in nivolumab-treated patients with non-small cell lung cancer [J]. JAMA Oncol，2018，4（8）：1112-1115.

[26] Kotake M，Murakami H，Kenmotsu H，et al. High incidence of interstitial lung disease following practical use of osimertinib in patients who had undergone immediate prior nivolumab therapy [J]. Ann Oncol，2017，28（3）：669-670.

[27] Yamaguchi O，Kaira K，Kawasaki T，et al. Severe hepatotoxicity due to osimertinib after nivolumab therapy in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutation [J]. Thorac Cancer，2020，11（4）：1045-1051.

[28] Brahmer JR，Drake CG，Wollner I，et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1（MDX-1106）in refractory solid tumors：safety，clinical activity，pharmacodynamics，and immunologic correlates [J]. J Clin Oncol，2010，28（19）：3167.

[29] Jänne PA，Yang JCH，Kim DW，et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer [J]. New Engl J Med，2015，372（18）：1689-1699.

[30] Zhao H，Cao J，Chang J，et al. Pharmacokinetics of osimertinib in Chinese patients with advanced NSCLC：a phase 1 study [J]. J Clin Pharmacol，2018，58（4）：504-513.

[31] Shinno Y，Goto Y，Ohuchi M，et al. The long half-life of programmed cell death protein 1 inhibitors may increase the

frequency of immune-related adverse events after subsequent EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy [J]. JTO CRR，2020，1（1）：100008.
[32] Centanni M，Moes DJAR，Trocóniz IF，et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of immune checkpoint inhibitors [J]. Clin Pharmacokinet，2019，58（7）：835-857.
[33] Hotchkiss RS，Colston E，Yende S，et al. Immune checkpoint inhibition in sepsis：a phase 1b randomized study to evaluate the safety，tolerability，pharmacokinetics，and pharmacodynamics of nivolumab [J]. Intens Care Med，2019，45（10）：1360-1371.
[34] Martins F，Sofiya L，Sykiotis GP，et al. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors：epidemiology，management and surveillance [J]. Nat Rev Clin Oncol，2019，16（9）：563-580.
[35] Friedman CF，Proverbs-Singh TA，Postow MA. Treatment of the immune-related adverse effects of immune checkpoint inhibitors：a review [J]. JAMA Oncol，2016，2（10）：1346-1353.
[36] Califano R，Tariq N，Compton S，et al. Expert consensus on the management of adverse events from EGFR tyrosine kinase inhibitors in the UK [J]. Drugs，2015，75（12）：1335-1348.

（收稿日期：2022-10-27；修回日期：2023-02-13）

能量色散 X 射线荧光光谱在中药材分析中的研究进展

陈前，李进良，李沛波，吴灏，彭维，苏薇薇，王永刚*（中山大学生命科学学院，广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心/广东省热带亚热带植物资源重点实验室，广州 510275）

摘要：能量色散 X 射线荧光光谱（EDXRF）是一种对物质中元素进行定性、定量分析的方法。本文在文献调研的基础上阐述了 EDXRF 技术的基本原理，通过与常用光谱技术进行简单比较分析其优缺点，同时结合中药研究的特点和需求，简述其在中药材元素含量测定、中药材重金属元素含量检测、中药材产地溯源和中药材真伪鉴别等方面的应用现状，并对未来的发展趋势进行展望，以期为该技术更好地用于中药材分析研究提供参考。

关键词：能量色散 X 射线荧光光谱技术；中药材分析；研究进展
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1870-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.029

Research progress of energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy in analysis of Chinese medicinal materials

CHEN Qian, LI Jin-liang, LI Pei-bo, WU Hao, PENG Wei, SU Wei-wei, WANG Yong-gang*
(*Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-evaluation of Post-marketed Traditional Chinese Medicine, Guangdong Key Laboratory of Plant Resources, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou* 510275)

Abstract: Energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy (EDXRF) is both a qualitative and quantitative analysis method for elements in substances. Based on literature research, this paper expounded the basic principles of EDXRF technology, compared shows its advantages and disadvantages with commonly used spectroscopic techniques, and briefly described its application status in terms of determination of element content of Chinese medicinal materials, detection of heavy metal content in Chinese medicinal materials, traceability of origin of Chinese medicinal materials and authenticity identification of Chinese medicinal materials. We also predicted to the future development trend to provide reference for the better application of this technology in the analysis of Chinese medicinal materials.

Key words: energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy technology; Chinese medicinal material; research progress

作者简介：陈前，女，硕士，主要从事中药药物分析研究，email：chenq389@mail2.sysu.edu.cn *通信作者：王永刚，男，副教授，主要从事天然产物的研究与开发，email：wangyg@mail.sysu.edu.cn

能量色散 X 射线荧光光谱（energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry，EDXRF）技术是一种通过检测元素特征荧光的能量和强度来进行定性和定量分析的技术。EDXRF 技术具有样品制备简单、分析无损、能够同时检测多种元素和分析速度快的特点 [1-2]，广泛应用于历史考古 [3-5]、食品 [6-8]、农业 [9-10] 和医药 [11-16] 等多个领域。随着中药现代化的发展，中药材分析得到了更加深入的研究 [17-19]。目前用于中药材分析的有原子吸收光谱法（AAS）、原子发射 / 荧光光谱法（AES/AFS）、电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）、电感耦合等离子体原子发射光谱法（ICP-AES）和激光诱导击穿光谱法（LIBS）等。这些技术在应用中已有较高的准确度和精确度，但仍存在各自的局限性 [20-27]。EDXRF 技术在 X 射线荧光光谱法（XRF）的基础上提高了精确度和使用灵活度，有效弥补了其他技术在定性和定量能力上的不足 [28]，且可以根据不同的环境和检测目的灵活使用，对目标成分进行高灵敏的定量分析，对未知成分进行快速、精确的确证。基于 EDXRF 技术的多种优势，其在中药领域的应用日益增加 [29-31]，主要是在微量元素的分析，假冒伪劣药材的鉴别，重金属的检测和产地溯源的探究 [1，17] 等方面。将 EDXRF 技术更广泛、更深入地应用于中药研究中，有望使中药材成分分析和鉴别更加高效、准确。本文旨在介绍 EDXRF 技术的基本原理和方法，简述其与常用元素分析技术相比所具有的优势与局限性，同时结合中药研究的特点和需求对其未来的发展趋势进行展望，以期为该技术更好地用于中药材分析研究提供参考。

1　EDXRF 技术简介

EDXRF 技术是一种利用 EDXRF 仪对待测样品进行分析的方法，EDXRF 仪是在 XRF 仪的基础上发展而来的。X 射线和 X 射线荧光是在 19 世纪 90 年代末相继发现的 [32]。在随后的 1908—1955 年间，科学家深入研究了 X 射线，发现特征 X 射线，建立了布拉格定律、莫塞莱定律，提出了谢曼方程，构建了 X 射线荧光分析的理论体系，随着核物理技术取得巨大发展，XRF 仪被成功研发 [33-36]。1969 年，美军的 Birks 实验室研制出第一台 EDXRF 仪，但因为探测器的分辨率较差使其应用遭到限制。此后，对探测器分辨率的研究不断深入，EDXRF 仪逐渐用于实际生活 [37-38]，并在计算机行业迅速发展的带领下，EDXRF 仪也开始朝着多功能化、高分辨率、高灵敏度、智能化以及使用便捷的方向发展。

1.1　EDXRF 测定原理

EDXRF 光谱仪的系统包括激发源、样品室、探测器、信号处理电路、多道脉冲幅度分析器、计算机和电源 [39]，如图 1 所示。当激发源的原级 X 射线照射样品时，样品中待分析的元素会被激发产生特征 X 射线。X 射线束中的 X 射线传到探测器，被转换为脉冲形状的电信号，脉冲信号经过整形放大电路的微分、放大、滤波及基线恢复等一系列的处理，使 X 射线能够被测量，从而形成标准的电脉冲信号。转换器再将电脉冲信号转为数字量，经处理后形成光谱。不同样品的 X 射线束不同，产生的光谱也不同，光谱作为样品的标识被传送到计算机进行下一步处理 [33-36，40]。各部件作用见表 1。

表 1　EDXRF 光谱仪的硬件部件及作用类型

Tab 1　Hardware components and function types of EDXRF spectrometer

部件	作用	类型
激发源	激发样品中元素特征 X 射线的设备，发射出原级 X 射线，决定特征 X 射线的质量	放射性同位素、同步辐射源、X 射线管（常用）
探测器	将 X 射线转换为电信号的仪器	锂漂移硅探测器、硅漂移探测器、Si-PIN 探测器（常用）
样品室	放置待检测样品	—
信号处理器	负责将探测器输出的信号放大、整形	—
多道脉冲幅度分析器	识别信号处理器输出的脉冲信号峰值，根据其大小形成峰值	—

1.2　EDXRF 技术与其他分析技术的比较

EDXRF 与 AAS、AES、AFS、ICP-MS、ICP-AES、LIBS 均为元素检测分析技术，但其工作原理不同，所具有的优缺点也不一致，如表 2 所示，EDXRF 技术作为一种相对比较全能的检测分析技术，基本能有效弥补其他技术的缺陷。

1.3　EDXRF 技术定量分析的方法

EDXRF 技术定量分析的方法有很多。按基体校正方法的不同，可以分为 4 种，即经验系数法、基本参数法、影响系数法和实验校正法。而实验校正法又包括校正曲线法、内标法和比例常数法，主要是绘制分析浓度函数的强度。其中基本参数

表 2 EDXRF 与其他技术的技术原理与优缺点

Tab 2 Technical principles，advantages and disadvantages of EDXRF and other technologies

方法	技术原理	优点	缺点
AAS	电子从基态跃迁到激发态，电磁辐射强度减弱，产生原子吸收光谱	检测限低、准确度高、应用广，可测定 70 多种元素 [41]	难熔元素、非金属元素测定困难，不能同时测定多种元素
AES	利用原子或离子在一定条件下受激而发射的特征光谱来研究物质的化学组成	灵敏度高、选择性好、分析速度快、试样消耗少	仪器昂贵、谱线复杂、检测灵敏度较低 [43]
AFS	受特征波长照射，自由原子被激发跃迁到较高的能态，然后去活化回到某一能态而发出特征光谱	灵敏度高，谱线简单，光谱范围较宽，适合多元素的同时测量	存在荧光淬灭效应和散射光干扰 [42]
ICP-MS	由高频电流产生的高频磁场使工作气体离子化并呈火焰状放电激发待测样品	检测限低、灵敏度高、分析速度快，可测定几乎所有的元素	运行费用高、需要好的操作经验、样品介质影响较大 [44]
ICP-AES	ICP 和 AES 联用	分析速度快、检测限低、基体效应小、精度高、应用广泛	破坏分析样品、仪器昂贵及维护成本高、需要预处理样品等 [45]
LIBS	原子外层电子激发	分析速度快、无损分析、制样简单	成本较高，基体效应大，激光本身会产生干扰，实用性较差，精确度比 XRF 差 [27]
EDXRF	原子内层电子激发；元素不同特征激发能不同	分析速度快、灵敏度高、无损样品、绿色环保、制样操作简单、范围广，适合现场分析及多种元素分析 [46]	光谱构成较复杂、特征峰会发生重叠等

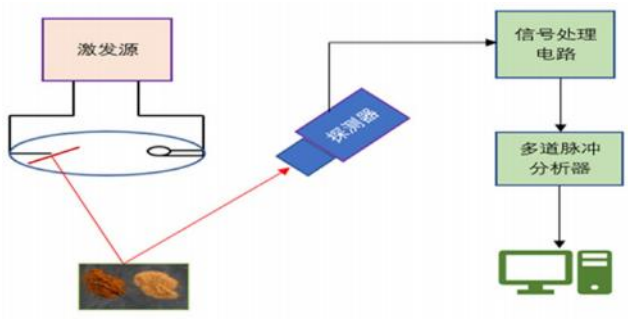


图 1 EDXRF 仪的硬件系统

Fig 1 Schematic diagram of EDXRF spectrometer

法是应用最广泛的方法，它通过应用 X 射线荧光强度公式运算获知样品含量 [47]。Zhang 等 [48] 运用 EDXRF 技术实验校正法分析植物样品中的 S 和 P 元素，建立了 P、S、Ca 和 Fe 的校准曲线，以评价定量分析方法的准确性。Shaltout 等 [49] 使用 EDXRF 基本参数法定量分析尿结石中的元素含量时，同时检测出将样品压制成粉末过程中所加入的不同黏合剂中的杂质元素含量，表明在尿结石样品的元素定量分析过程中应考虑减去这些杂质。这提示了在具体研究中，可根据元素检测目的不同，选择不同方法进行优化，以提高测量精准度。

2 EDXRF 技术在中药材中的应用

2.1 EDXRF 技术在中药材元素含量测定中的应用

元素的种类及含量与中药药性、四气五味、归经、功效等有重要关系 [50]。Desideri 等 [51] 利用 EDXRF 技术测定意大利几种茶叶、甘菊叶以及果实中的必需和非必需元素含量，发现不同植物的元素含量比例取决于其生长的土壤组成和气候条件。Mohammad 等 [52] 使用 EDXRF 对两种不同烟草产品中的微量元素进行分析，从而确定了这两种产品中的微量元素含量。秦旭磊等 [53] 利用 EDXRF 法检测茶叶中元素含量来判断茶叶是否符合标准。Nedjimi 等 [54] 采用 EDXRF 技术对两种阿尔及利亚百里香 [*Thymus algeriensis* Boiss & Reut. 和 *Thymus capitatus*（L.）] Hoffm. & Link 中的微量元素进行定量，结果表明，*Thymus algeriensis* 中的微量营养元素（Br、Cr、Cu、Mn、Sr、V 和 Zn）浓度最高，而 *Thymus capitatus* 中的 Ca、Fe 和非必需元素 Rb 的浓度最高，两个物种的钾含量相似。

EDXRF 技术不仅可以进行定量分析，还可以用于安全性评价。Asiedu-Gyekye 等 [55] 用 EDXRF 仪检测出辣木叶中 14 种常量元素和 21 种微量元素的浓度，结果显示所有浓度均在每日膳食水平推荐允许摄入量的限值内。这表明食用辣木叶粉对人体安全且能够为食用者提供机体活动所必需的矿物质。此研究方法为辣木叶片的安全性提供了评价。

2.2 EDXRF 技术在中药材重金属检测中的应用

重金属含量超标不仅严重影响中药的用药安全，同时也阻碍了中药的国际贸易，限制了中医药事业的发展。当前，含量低微、分析困难导致中药材中重金属的研究仍然十分薄弱，选择适合的检测分析方法是解决中药重金属超标问题的关键 [56-58]。不同于传统的方法，EDXRF 技术制样较简单，不会破坏样品，可直接进行重金属元素分析 [59]。Zawisza 等 [60] 采用 EDXRF 技术分析了

南非草药茶中的重金属元素的含量，并以此判定饮用这些南非凉茶是否会对消费者的健康造成潜在威胁。王毅等[61]运用 EDXRF 法测定山楂中的有害金属元素 As、Cr、Pb 的含量，并将 EDXRF 的测量结果与 ICP-AES 对比，结果表明 EDXRF 法测定准确，适用于大量中药材金属元素的快速测定。Huang 等[62]应用 EDXRF 技术定位监测黄连中的 Cr 元素，取得了较好的效果，为其他中药材中 Cr 元素的快速分析检测提供了参考。张辉等[63]利用 EDXRF 法快速测定中草药中的 Cd 元素，其结果满足 GB/T4889—2008 数据的统计处理标准。Caniglia 等[64]利用 EDXRF 光谱法测定了暴露在城市和高度工业化地区的地衣中的 Cr、Fe、Ni、Cu、Zn 和 Pb 的含量，结果显示随着暴露的时间增加，地衣中的金属浓度都增加。

药材种植的土壤是中药材受重金属污染的源头，对种植土质的检测也是理清污染源头的方法，但是目前很多仪器无法进行现场检测。而便携式 EDXRF 仪可以进行原位现场分析，不受环境条件限制，拓宽了中药材的分析方法。

2.3 EDXRF 技术在中药材产地溯源中的应用

药材质量受多种因素影响，其中一个比较重要的因素就是产地，中药组成和含量取决于生长期间的环境条件，药材元素含量反映生长土壤的元素组成，因此对中药材的产地进行识别非常重要[65-66]。多元素图谱可以作为确定产地的有用工具，EDXRF 技术是多元素图谱分析常用技术之一。Ocvirk 等[67]采用非破坏性 EDXRF 技术对世界各主要产区啤酒花植物的多元素图谱进行了测定，从而确定啤酒花的来源产地。Fiamegos 等[68]使用 EDXRF 法结合化学计量模型分析蜂蜜中 Cl、K、Ca、Fe、Zn、Mn 和 Rb 等元素的组成，结果显示 K 元素的含量变化最大，而在化学计量模型的帮助下，不同元素的质量分数差异可以确认蜂蜜商业化标签上所示的植物品种和地理来源。Choi 等[69]使用 EDXRF 法鉴别芝麻来源，其结果显示，除 Fe 外，所有元素均表现出差异，96.5% 的种子样品为正确的来源。Fiamegos 等[70]运用 EDXRF 对来自西班牙中西部 23 个地区的原产地命名保护（PDO，Protected Denomination of Origin）辣椒产品进行分析，从而确定产品的地理来源。

2.4 EDXRF 技术在中药材的真伪鉴别中的应用

在中药材市场上，存在同名不同种，同种不同名以及药材间相互伪充等问题，造成中药材质量下降，从而影响中药的作用发挥。因此，鉴别中药材的真伪是中药质量控制的关键。一般在中药材真伪鉴别中最常用的方法是红外光谱法，但是其测定结果会受到样本所处的检测环境和条件影响，同时样本本身性质会因环境改变而产生一定的变化，使测量结果的准确性降低[71-73]。EDXRF 是一种高通量多元素检测分析技术，不需要复杂的样品预处理，因此是常规控制检测分析的理想选择[74]。如饶秀勤等[75]选用 EDXRF 技术结合模式识别技术对 4 种茶叶进行鉴别，结果表明不同产地的茶叶其元素含量有所差异。Li 等[76]应用 EDXRF 技术替代显微和组织化学等方法来区分正宗发菜和假冒品，结果显示除了在显微镜下观察到原核细胞的珠状细丝的存在外，正宗发菜显示出具有代表性的元素指纹。Masten 等[77]使用 EDXRF 对市售螺旋藻补充剂的元素进行表征，将测量结果与其标签上的营养成分表比较，结果显示 Fe、Mn、Ca、Zn 和 P 等元素含量与营养成分表上的说明均有不同程度的偏差。

在中药材的真伪品鉴别中，为了能够快速鉴定，传统鉴别方法会对检测样品进行预处理，因此不可避免地使用一些化学试剂，这会造成残留和污染等问题，而 EDXRF 技术可以有效地排除来自仪器、试剂和环境的污染源。

3 讨论

EDXRF 技术虽然具有多种优势，但其较少用于中药领域。究其原因，有以下几点可能：其一，中药现代化的发展过程中，人们大多致力于寻找中药中的有机化合物以期阐明中药的物质基础及其发挥作用的机制，对于中药材中的元素组成关注度不高，而 EDXRF 技术主要是用于元素定性定量分析；其二，过去人们对于中药材重金属残留重视度不够，限量标准在近几年有更严格的规定，各种新型检测技术才开始得到应用[56，78]；其三，由于早期的探测器精确度和灵敏度不高，EDXRF 技术发展遭到限制，人们优先选择了其他精确度较高的分析技术，导致 EDXRF 技术在中药中的应用滞后。

作为一种绿色的多元素快速检测分析技术，EDXRF 技术符合可持续发展的环保理念。在与同类技术相差无几的精确度检测水平下，对昂贵、数量少或前处理步骤复杂的样品进行检测分析有突出优势，而中药里有许多名贵药材，选择此技术可能有利于降低研究成本。对大量样本数的多元素分析也能快速完成，可有效缩短实验时间[79]。因此，在实际应用中，可以根据检测目的

出发，选择适当方法或与其他技术联用，从而发挥 EDXRF 技术在中药质量分析的多个环节应用中的优势。

4 展望

虽然 EDXRF 技术有很多优势，但仍然具有一定的局限性，由于极端矩阵效应、光谱重叠及基质效应的影响，导致在计算特征峰位和峰面积上存在困难[80-81]；在 X 射线的产生过程中会有噪声产生，这不仅会降低分辨率，还会影响特征峰的识别[32-33]；探测器的分辨率有限，导致其检测的灵敏度不够高[35-36]。针对以上问题，可以安装矩阵效应校正程序、初级过滤器和真空气氛装置、改进背景估计算法以增加 EDXRF 技术分析的灵敏度。还可以结合多种其他分析技术手段如扫描电子显微镜（SEM）、傅里叶红外光谱（FTIR）等，对样品进行前处理[39，82-83]。目前，在研究 EDXRF 的探测器以提高其精确度和灵敏度的同时，大多研究已将 EDXRF 技术与其他技术进行联用应用，其结果均比单独使用 EDXRF 好[84]。综上所述，随着多种技术的联用和光谱仪体积的逐渐减小，EDXRF 技术在中药材中的应用将朝着高精确度、高灵敏度、高稳定性、低功率和小型化的方向发展。

参考文献

[1] Jyothsna S，Manjula G，Suthari S，et al. Qualitative elemental analysis of selected potential anti-asthmatic medicinal plant taxa using EDXRF technique [J]. Heliyon，2020，6（2）：1-7.

[2] Morona F，Dos SF，Brinatti AM，et al. Quick analysis of organic matter in soil by energy-dispersive X-ray fluorescence and multivariate analysis [J]. Appl Radiat Isot，2017，130（3）：13-20.

[3] Aramendia J，de Vallejuelo SF，Maguregui M，et al. Long-term in situ non-invasive spectroscopic monitoring of weathering processes in open-air prehistoric rock art sites [J]. Anal Bioanal Chem，2020，412（29）：8155-8166.

[4] El-Gohary M，Redwan M. Alteration parameters affecting the luxor avenue of the Sphinxes-Egypt [J]. Sci Total Environ，2018，626（68）：710-719.

[5] Navas MJ，Asuero AG，Jimenez AM. A review of energy dispersive X-ray fluorescence（EDXRF）as an analytical tool in numismatic studies [J]. Appl Spectrosc，2016，70（1）：207-221.

[6] Lerner N，Sedgi I，Chernia Z，et al. Rapid direct determination of tin in beverages using energy dispersive X-ray fluorescence [J]. Talanta，2019，199：662-666.

[7] Ghidotti M，Fiamegos Y，Dumitrascu C，et al. Use of elemental profiles to verify geographical origin and botanical variety of Spanish honeys with a protected denomination of origin [J]. Food Chem，2021，342（16）：45-47.

[8] Peruchi LC，Nunes LC，de Carvalho G，et al. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry [J]. Spectrochim Acta B，2014，100（9）：129-136.

[9] Paltridge NG，Palmer LJ，Milham PJ，et al. Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain [J]. Plant Soil，2012，361（1-2）：251-260.

[10] Daly K，Fenelon A. Application of energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry to the determination of copper，manganese，zinc，and sulfur in grass（Lolium perenne）in grazed agricultural systems [J]. Appl Spectrosc，2018，72（11）：1661-1673.

[11] Okonda JJ，Angeyo KH，Mangala JM，et al. A nested multivariate chemometrics based calibration strategy for direct trace biometal analysis in soft tissue utilizing Energy Dispersive X-ray fluorescence（EDXRF）and scattering spectrometry [J]. Appl Radiat Isot，2017，129（18）：49-56.

[12] 陈旭鑫，李子琪，骆丁玲等 . 基于能量色散型 X 射线荧光光谱法煤中全硫含量的测定 [J]. 煤炭学报，2020，45（8）：2933-2939.

[13] Rebiere H，Kermaidic A，Ghyselinck C，et al. Inorganic analysis of falsified medical products using X-ray fluorescence spectroscopy and chemometrics [J]. Talanta，2019，195（20）：490-496.

[14] Chowdhury AR，Maheshwari N，Soni J，et al. Quantitative X-ray fluorescence analysis：trace level detection of toxic elemental impurities in drug product by ED-XRF spectrometer [J]. J Pharm Biomed Anal，2020，189（12）：113-115.

[15] Silva MP，Soave DF，Ribeiro-Silva A，et al. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer：a study through energy dispersive X-ray fluorescence [J]. BMC Res Notes，2012，5（1）：1-11.

[16] Ensina A，Carvalho PM，Machado J，et al. Analysis of human tissues using energy dispersive X-ray fluorescence-dark matrix determination for the application to cancer research [J]. J Trace Elem Med Biol，2021，68：1-6.

[17] 马江媛，桑晓霞，李叶丽，等 . 基于能量色散 X 射线荧光光谱分析技术对茶叶检测条件的优化 [J]. 食品与发酵工业，2020，46（4）：282-286.

[18] Kulal C，Padhi RK，Venkatraj K，et al. Study on trace elements concentration in medicinal plants using EDXRF technique [J]. Biol Trace Elem Res，2020，198（1）：293-302.

[19] 秦俊法 . 中国的中药微量元素研究 Ⅴ. 微量元素：中药质量控制不可或缺的特征参数 [J]. 广东微量元素科学，2011，18（3）：1-20.

[20] 曹凤玲，赖国银，郑慧斐，等 . 精神科常用中草药的

微量元素检测 [J]. 检验医学与临床，2019，16（14）：1982-1984.
[21] 刘杰，熊亮，周勤梅，等 . 中药道地性研究新技术应用进展 [J]. 中医药学报，2021，49（8）：182-185.
[22] 张珉，柳菁 . 国内中药市场微观环境分析 [J]. 现代经济信息，2015，15（3）：382-384.
[23] 赵恒强，张敏敏，赵志国，等 . 多元素分析结合多元统计分析用于丹参产地溯源研究 [J]. 天然产物研究与开发，2017，29（10）：1752-1758.
[24] 熊文朋，谢跃生，杨剑，等 . 中药微量元素分析方法概述 [J]. 中医药临床杂志，2015，27（4）：567-570.
[25] Patil-Bhole T，Wele A，Gudi R，et al. Nanostructured gold in ancient Ayurvedic calcined drug‘swarnabhasma’[J]. J Ayurveda Integr Med，2021，12（4）：640-648.
[26] 赵一懿，陈炼明，郭洪祝，等 . 基于 ICP-MS 技术在中药无机元素的分析应用与评价方法探讨 [J]. 中国新药杂志，2019，28（1）：54-59.
[27] 刘晓娜，王喜波，车晓青，等 . LIBS 技术在中药质量快速评价中的应用及研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2020，22（4）：1262-1269.
[28] Dhara S，Sanyal K，Misra NL. Universal EDXRF method for multi-elemental determinations using fused bead specimens [J]. Anal Sci，2019，1（36）：43-46.
[29] Uitdehaag S，Wiarda W，Donders T，et al. Forensic comparison of soil samples using nondestructive elemental analysis [J]. J Forensic Sci，2017，62（4）：861-868.
[30] Akyuz T，Akyuz S，Gulec A. Elemental and spectroscopic characterization of plasters from Fatih Mosque-Istanbul（Turkey）by combined micro-Raman，FTIR and EDXRF techniques [J]. Spectrochim Acta AMol Biomol Spectrosc，2015，49（11）：19-22.
[31] 陈碧聪，陈语嫣 . 能量色散 X 射线荧光光谱法在食品检测中的应用 [J]. 现代食品，2021，19（6）：143-149.
[32] 袁昌旺 . 能量色散 X 射线荧光光谱仪的设计 [D]. 南京：东南大学，2019.
[33] 赵奉奎，王爱民 . 能量色散 X 射线荧光光谱仪研究现状 [J]. 核技术，2013，36（10）：54-60.
[34] 赵奉奎 . 能量色散型 X 射线荧光光谱仪关键技术研究 [D]. 南京：东南大学，2015.
[35] 陈远盘 . 全反射射线荧光光谱的原理和应用 [J]. 分析化学，1994，4（22）：406-414.
[36] 罗立强，马光祖 . 基于知识的 X 射线荧光光谱研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析，2001，12（6）：871-875.
[37] Friedman H，Birks LS. A geiger counter spectrometer for X-ray fluorescence analysis [J]. Rev Sci Instrum，1984，19（5）：323-330.
[38] 杨明太，唐慧 . 能量色散 X 射线荧光光谱仪现状及其发展趋势 [J]. 核电子学与探测技术，2011，31（12）：1307-1311.
[39] 戴志勇 . 能量色散 X 射线荧光光谱仪系统设计 [D]. 南京：东南大学，2018.
[40] 蔡鲲 . X 荧光光谱分析软件的开发与应用 [J]. 光谱学与光谱分析，2001，21（5）：673-675.
[41] 武国华，陈艾亭，李龙 . 原子吸收光谱法在中草药微量元素及重金属分析中的应用 [J]. 江苏科技大学学报（自然科学版），2012，26（6）：615-623.
[42] 项亮，李云 . 原子发射光谱分析技术及其发展和应用 [J]. 化工管理，2015，36（9）：78-80.
[43] 袁姗姗，苏红丽，朱涵静，等 . 原子荧光光谱技术的发展历程及研究进展 [J]. 河南化工，2021，38（9）：7-10.
[44] 贾海峰，刘恒杰，陈晨 . ICP-MS 法在测定痕量贵金属中的应用分析 [J]. 广东化工，2020，47（2）：150-153.
[45] 王董云，赵慧 . 微波消解电感耦合 - 等离子体发射光谱法同时测定复方氢氧化铝片中铝和镁含量 [J]. 中国药业，2021，30（21）：76-78.
[46] Gore DB，Davis G. Suitability of transportable EDXRF for the on-site assessment of ancient silver coins and other silver artifacts [J]. Appl Spectrosc，2016，70（5）：840-845.
[47] 赵志强，周珺 . 能量色散 X 射线荧光光谱中玻璃的定量分析方法 [J]. 湖南考古辑刊，2018（1）：310-316.
[48] Zhang XL，Shan Q，Liu Y，et al. Quantitative analysis of phosphorus and sulfur in vegetation samples at minor and trace levels by EDXRF technique [J]. Appl Radiat Isot，2021，167：1-7
[49] Shaltout AA，Dabi MM，Ibrahim MM，et al. Applicability of low-cost binders for the quantitative elemental analysis of urinary stones using EDXRF based on fundamental parameter approach [J]. Biol Trace Elem Res，2020，195（2）：417-426.
[50] 陈依晴，孙发哲 . 近红外光谱技术在中药质量检测中的应用 [J]. 轻工科技，2020，36（11）：77-78.
[51] Desideri D，Meli MA，Roselli C，et al. Determination of essential and non-essential elements in herbal tea and camomile by polarised X rays fluorescence spectrometer（EDXRF）[J]. J Radioanal Nucl Ch，2011，290（2）：391-396.
[52] Mohammad AB，Mohammad S，Mohammad MK，et al. Quantification of trace elements in different dokha and shisha tobacco products using EDXRF [J]. J Anal Toxicol，2019，43（4）：7-22.
[53] 秦旭磊，李野，宋忠华 . 基于 EDXRF 技术茶叶中金属元素检测方法研究 [J]. 光谱学与光谱分析，2015，35（4）：1068-1071.
[54] Nedjimi B. Trace element quantification in two Algerian Thymes [*Thymus algeriensis* Boiss & Reut. and *Thymus capitatus*（L.）Hoffm. & Link] using EDXRF spectrometry [J]. Biol Trace Elem Res，2022，10（12）：104-108.
[55] Asiedu-Gyekye IJ，Frimpong-Manso S，Awortwe C，et al. Micro- and macroelemental composition and safety evaluation of the Nutraceutical Moringa oleifera Leaves [J]. J Toxicol，2014，20（18）：7-13.
[56] 楚楚，李璟，颜继忠 . 中药重金属限量标准现状及分析方法研究进展 [J]. 浙江工业大学学报，2021，49（4）：435-441.
[57] 张雪洁，邱瀚弘，于润琪，等 . 中药材重金属脱除方法研究进展 [J]. 药物评价研究，2018，41（12）：2381-2384.
[58] 范家文，刘仕灵，韦对，等 . 中药中重金属检测的研

究 [J]. 微量元素与健康研究，2018，35（5）：38-39.
[59] Obhođaš J，Valković V，Matjačić L，et al. Evaluation of elemental composition of sediments from the Adriatic Sea by using EDXRF technique [J]. Appl Radiat Isot，2012，70（7）：1392-1395.
[60] Zawisza B，Musielak M，de Beer D，et al. Non-destructive elemental analysis of herbal teas from South Africa [J]. J Food Compos Anal，2021，102（9）：104-109.
[61] 王毅，方萍，李晶，等 . 能量色散 X 射线荧光光谱快速测定山楂中 As、Cr、Pb 含量 [J]. 西部中医药，2018，31（11）：21-25.
[62] Huang WL，Jiao J，Ru M，et al. Localization and speciation of Chromium in *Coptis chinensis* Franch. using synchrotron radiation X-ray technology and laser ablation ICP-MS [J]. Sci Rep，2018，8（1）：33-36.
[63] 张辉，刘召贵，殷月霞，等 . 能量色散 X 射线荧光光谱法测定中草药中的 Cd 元素 [J]. 分析测试技术与仪器，2019，25（3）：191-195.
[64] Caniglia G，Calliari I，Celin L，et al. Metal determination by EDXRFA in lichens：a contribution to pollutants monitoring [J]. Biol Trace Elem Res，1994，20（12）：43-45.
[65] 吴伟梅，杜建平，阮文佳，等 . 岭南道地药材产地溯源系统研究现状浅析 [J]. 按摩与康复医学，2021，12（24）：95-97.
[66] 王黎明，吴浩，林光辉 . 稳定同位素技术在中药产地溯源方面的应用研究进展 [J]. 同位素，2015，28（4）：225-232.
[67] Ocvirk M，Necemer M，Kosir IJ. The Determination of the Geographic Origins of Hops（Humulus lupulus L.）by Multi-Elemental Fingerprinting [J]. Food Chem，2018，20（17）：271-277.
[68] Fiamegos Y，Dumitrascu C，Ghidotti M，et al. Use of energy-dispersive X-ray fluorescence combined with chemometric modelling to classify honey according to botanical variety and geographical origin [J]. Anal Bioanal Chem，2020，412（2）：463-472.
[69] Choi YH，Hong CK，Park GY，et al. A nondestructive approach for discrimination of the origin of sesame seeds using ED-XRF and NIR spectrometry with chemometrics [J]. Food Sci Biotechnol，2016，25（2）：433-438.
[70] Fiamegos Y，Dumitrascu C，Papoci S，et al. Authentication of PDO paprika powder（Pimentón de la Vera）by multivariate analysis of the elemental fingerprint determined by ED-XRF. A feasibility study [J]. Food Control，2021，120：1-10.
[71] 卢广英，刘红燕，邢训颜，等 . 扫描电镜在中药真伪鉴别中的应用 [J]. 电子显微学报，2021，40（4）：483-487.
[72] 王钰，杨茜岚，梁政安，等 . 关于中药材真伪品、中药饮片鉴别技术的总结 [J]. 科学大众（科学教育），2016，12（8）：191-192.
[73] 赵中振，梁之桃 . 近红外光谱技术在中药鉴定中的应用与优势 [J]. 中国中药杂志，2012，37（8）：1062-1065.
[74] Guembou SC，Tayou KC，Nguelem ME，et al. Recovering and restitution of unknown，unidentified，and unlabeled samples in laboratories using EDXRF analysis [J]. Methods X，2021，8（12）：101-105.
[75] 饶秀勤，应义斌，黄海波，等 . 基于 X 射线荧光技术的茶叶产地鉴别方法研究 [J]. 光谱学与光谱分析，2009，29（3）：837-839.
[76] Li A，Yat YW，Yap WK，et al. Discriminating authentic Nostoc flagelliforme from its counterfeits by applying alternative ED-XRF and FTIR techniques [J]. Food Chem，2011，129（2）：528-532.
[77] Masten RJ，Jagodic HM，Necemer M，et al. Nutritional quality and safety of the spirulina dietary supplements sold on the slovenian market [J]. Foods，2022，11（6）：849-854.
[78] 梁晓艳，梁旭霞 . 中药重金属超标的研究概况 [J]. 广西中医药，2021，44（3）：75-77.
[79] Lim CM，Carey M，Williams PN，et al. Rapid classification of commercial teas according to their origin and type using elemental content with X-ray fluorescence（XRF）spectroscopy [J]. Curr Res Food Sci，2021，4（5）：45-52.
[80] 张伟，陈树军，尹兆余，等 . 能量色散 X 射线荧光光谱在线分析中的难点及措施 [J]. 科技风，2021，21（5）：95-96.
[81] 冀彬彬 . X 射线荧光光谱分析技术的发展 [J]. 化工管理，2018，18（11）：82-84.
[82] Buchele D，Chao M，Ostermann M，et al. Multivariate chemometrics as a key tool for prediction of K and Fe in a diverse German agricultural soil-set using EDXRF [J]. Sci Rep-Uk，2019，9（1）：24-27.
[83] Zhao FK，Wang J，Wang AM. An improved spectral background subtraction method based on wavelet energy [J]. Appl Spectrosc，2016，70（12）：1994-2004.
[84] Manso M，Carvalho ML，Queralt I，et al. Investigation of the composition of historical and modern Italian papers by energy dispersive X-ray fluorescence（EDXRF），X-ray diffraction（XRD），and scanning electron microscopy energy dispersive spectrometry（SEM-EDS）[J]. Appl Spectrosc，2011，65（1）：52-59.

（收稿日期：2022-10-20；修回日期：2023-02-21）

改善外泌体应用局限性的研究进展

张茜，鲁卫东*（昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室，昆明　650500）

摘要：外泌体是一种由细胞分泌的纳米级胞外囊泡。有研究表明，外泌体在疾病治疗和药物递送系统中有较高的研究价值和临床应用前景。然而，产量低、功能不全面、储存困难等因素限制了外泌体的临床转化。本文就近几年来如何解决上述问题进行综述，以期为后续研究提供参考。

关键词：外泌体；脂质体；杂化外泌体；人工外泌体；药物载体

中图分类号：R392.28，R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1877-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.030

Research progress on improving the limitations of exosomess application

ZHANG Qian, LU Wei-dong* (*School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products*, *Kunming Medical University*, *Kunming*　650500)

Abstract: Exosomes are nanoscale extracellular vesicles secreted by cells. Studies have shown that exosomes have high research value and clinical application prospects in disease treatment and drug delivery systems. However, factors such as low yield, incomplete function, and difficult storage limit the clinical transformation of exosomes. We reviewed related articles in recent years, solutions for the above problems, which is an important reference for future research.

Key words: exosome; liposome; hybrid exosome; artificial exosome; drug carry

外泌体（exosomes）是一种细胞分泌的纳米级胞外囊泡，其主要成分包括蛋白质、microRNAs 和脂质等。外泌体作为细胞间胞质蛋白、核酸和脂质的转移载体发挥运输调控作用，所以外泌体被认为是细胞间通信的核心部分[1-3]。目前，外泌体已知的生物功能包括调控受体细胞基因转录和翻译、调节细胞代谢和增殖、促进血管生成和伤口愈合、参与中枢和外周系统的免疫调节、参与细胞凋亡与分化等[4]。外泌体的功能虽然强大，但产量低[5-6]、功能不够全面[7-9]、储存与运输条件苛刻[10]等问题限制了其临床转化。随着研究的不断深入，外泌体存在的问题已得到一定程度的改善，本文就近年来如何解决上述问题进行概述，以期为后续研究提供参考。

1　提高外泌体产量

外泌体是多囊泡体（MVB）与质膜（PM）融合后从细胞释放的纳米级膜囊泡，在细胞间通信和许多生物学过程中起重要作用[11]。已报道的几种有关外泌体的产生机制，主要包括神经元的质膜去极化[12]、Ca^{2+}内流[13]、Rab GTPase 家族的参与[14]等。外泌体产生后，由内吞作用导入的早期内体被分类到晚期内体，然后形成 MVB[15]，在 MVB 与 PM 的胞外融合后，通过几种信号通路被释放[16]，最典型的机制涉及内吞体分选转运复合体（ESCRT）。其机制由四个蛋白质复合物（ESCRT-0，ESCRT-Ⅰ、ESCRT-Ⅱ、ESCRT-Ⅲ）以及辅助蛋白质（Alix、VPS4、VTA-1）组成，这些蛋白质按顺序依次与外泌体结合并形成腔内囊泡（ILV）[17]。值得注意的是，ESCRT-Ⅲ复合物可通过形成螺旋，诱导囊泡向内萌芽和裂变，从而形成 MVB[18-20]（见图 1）。有研究表明，外泌体产生的另一种途径涉及神经酰胺的合成，这与诱导囊泡弯曲和出芽的机制有关[21]。某些外泌体的释放已被证明优先依赖于神经酰胺的合成[22-23]。已提出的第三种用于外泌体生物发生的机制与四棘蛋白介导的特定蛋白质有关，例如淀粉样蛋白、黑素体前蛋白（PMEL）等[23-24]。虽然外泌体的产生与释放机制已部分明确，但其依旧存在产量低的缺点。现有研究表明可通过使用高产干细胞[25]、低水平电处理（ET）、诱导脑蛋白（KIBRA）过表

作者简介：张茜，女，在读硕士研究生，主要从事脂质体在外泌体作用的研究，email：ochjod@163.com　*通信作者：鲁卫东，女，教授，硕士研究生导师，主要从事脂质体在外泌体作用的研究，email：13064244163@163.com

达、将肿瘤细胞与脂质体共孵育等方法提高外泌体产量。

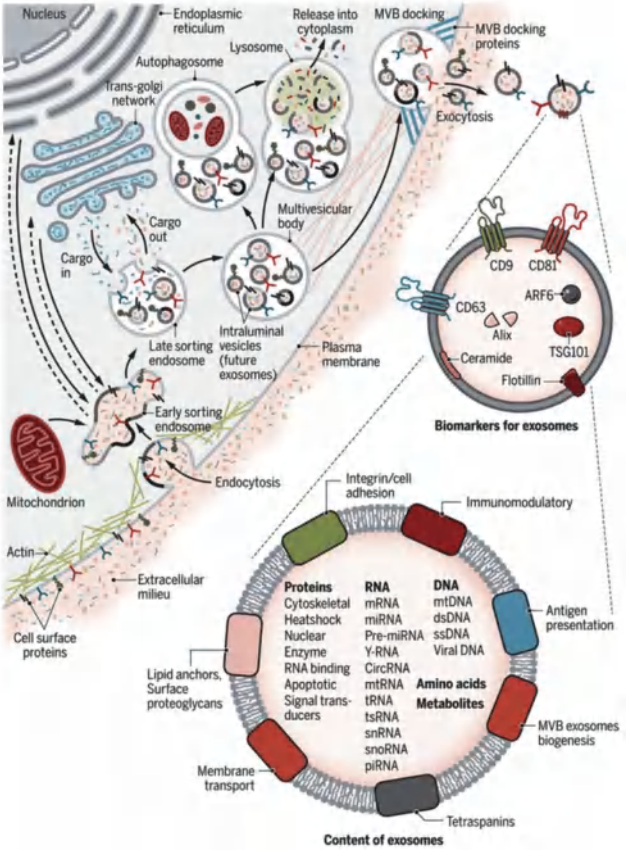


图 1 外泌体的形成过程 [6]

Fig 1 Exosome formation process[6]

培养细胞的 ET 可激活细胞内信号传导并诱导内吞作用，因此 Fukuta 等 [26] 大胆猜想 ET 也会提高外泌体产量，于是将两种细胞系 [B16F1 鼠黑色素瘤（代表性癌症细胞系）、3T3 瑞士白化病细胞（正常细胞系）] 分别进行 ET。结果表明 ET 不仅可以增加 B16F1 鼠黑色素瘤细胞和 3T3 瑞士白化病细胞的细胞外囊泡（EV）分泌，还显著增加了通过超速离心收集的 EV 颗粒的数量和蛋白质量，且对外泌体标志蛋白的表达、颗粒数与蛋白质量的比率、细胞毒性或颗粒分布无影响。

Rab27a 是一种调节 MVB-PM 对接的鸟苷三磷酸酶家族（GTPase）。而 KIBRA 作为一种适配器样蛋白，在稳定 Rab27a 不被降解方面起着至关重要的作用。KIBRA 通过泛素 - 蛋白酶体途径防止 Rab27a 的泛素化和降解。Song 等 [11] 研究表明 KIBRA 是稳定 Rab27a 的衔接子样蛋白，而 Rab27a 可控制体外和体内的外泌体分泌。通过敲低或过表达神经元和足细胞细胞系中的 *KIBRA* 基因导致外泌体分泌减少或增加。通过比较 *KIBRA* 基因敲除小鼠和野生型小鼠大脑之间的蛋白质谱显示，*KIBRA* 基因敲除小鼠大脑内 Rab27a 显著降低。因此，可通过诱导 KIBRA 过表达来抑制 Rab27a 的蛋白酶体降解从而促进外泌体的分泌。

有研究表明将肿瘤细胞与具有不同理化性质的脂质体制剂一起孵育可促进外泌体的分泌并增加外泌体的产量 [27]。Emam 等 [28] 通过研究表面蛋白和外泌体摄取以了解细胞与脂质体的孵育是否会改变这些外泌体的生物学特性，结果表明，基于液体涂料（1，2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine）的阳离子脂质体比基于固体涂料氢化大豆磷脂酰胆碱（HSPC）的脂质体更有效地提高了外泌体产量，并且由固体阳离子脂质体诱导的外泌体出现了标志蛋白如 CD9、flotillin-1、annexin-A2 和 EGF 缺失的现象。在外泌体摄取实验中，未诱导的外泌体和液体阳离子脂质体诱导的外泌体的摄取量高于固体阳离子脂质体诱导的外泌体。此外，收集的外泌体摄取倾向取决于用于孵育的脂质体制剂的性质。

2 优化外泌体功能

2.1 杂化外泌体（脂质体 - 外泌体）

通常，杂化外泌体是通过将外泌体与脂质体结合来制备的，可赋予脂质体生物功能，并可广泛应用于细胞外囊泡的药物递送系统 [29]。杂化外泌体同时具备外泌体和脂质体的优良特性，如优异的生物相容性、高载药量、延长的循环时间，单核吞噬细胞系统（MPS）不清除，免疫逃逸性以及精确靶向肿瘤部位以快速释放药物 [30-32]。Li 等 [33] 通过超声、膜融合和挤压等方法将外泌体和脂质体杂交，构建了仿生纳米颗粒 HENPs。透射电子显微镜图像显示 HENPs 的形态为均匀的圆形，粒径为（125±6）nm，聚合物分散性指数（PDI）始终小于 0.2；Western blot 结果显示，天然外泌体和 HENPs 中 CD47、TSG101 和 CD9 的表达水平差异较小，并且与外泌体和脂质体相比，HENPs 在血液循环中更稳定。这提示 HENPs 在保留原有生物特性的同时，具有更好的稳定性。但是，由于外泌体尺寸较小，在封装外源大核酸（例如 CRISPR/Cas9 系统）方面效率有限 [34]。Lin 等 [9] 将 HEK293FT 细胞衍生的外泌体与表达 CRISPR/Cas9 的脂质体在 37 ℃下简单孵育 12 h，得到了杂交 NPs。杂交 NPs 通过将 CRISPR/Cas9 传递给间充质干细胞（MSCs），并在 MSCs 中表达封装的基因来实现基因编辑。

目前，天然外泌体存在稳定性差、组织靶向性不足等缺点，使其临床转化应用受限。近年采

用生物工程技术对外泌体进行修饰，获得了有特定功能的工程化外泌体，在疾病的靶向治疗方面发挥了重要作用。通过工程化外泌体（用 CD47 转染）和脂质体的膜融合形成的杂化纳米粒增加了药物递送效率并避免了 MPS 的清除 [35]。Cheng 等 [31] 通过将基因工程外泌体与载药热敏脂质体融合，设计了一种名为 hGLV 的杂化外泌体，证明了 CD47 过表达的 hGLV 在血液循环中更加稳定，并通过阻断 CD47 信号阻止了巨噬细胞介导的肿瘤细胞吞噬作用；此外，所得的 hGLV 可以显著靶向小鼠的同源肿瘤，实现肿瘤部位的优先积累。重要的是，hGLV 负载光热剂可以在静脉注射后在激光照射下实现优异的光热治疗（PTT）。Sun 等 [36] 开发了一种负载氯膦酸盐（CLD）的混合药物递送系统，由脂质体和成纤维细胞衍生的外泌体组成，具有防止吞噬和靶向成纤维细胞的特性，可有效地积聚在纤维化病变中，并表现出显著渗透肺纤维化组织的能力，从而提高同源外泌体对成纤维细胞的亲和力，用于治疗肺纤维化。

2.2 人工外泌体

天然存在的外泌体数量有限 [37]，基于外泌体的递送系统的开发仍然面临着一些严峻的挑战，包括缺乏标准化隔离和纯化方法，非大规模生产和低载药效率 [38]，阻碍了它们在药物递送中的应用。受仿生技术的启发，大量研究者转向了通过将多种细胞类型的细胞膜蛋白整合到合成磷脂双层中 [38]，以具有成本效益的方式制造外泌体模拟物有助于新型纳米载体的开发。

将脂质体与肽结合是开发人工外泌体的简单方法，如将经典脂质体与含有 MHC Ⅰ类 / 肽复合物结合制备成人工外泌体以模拟外泌体的功能 [39]。这些人工外泌体具有与天然外泌体相似的大小，并有效地靶向 T 细胞、半直接地激活和扩增 T 细胞。类似地，有研究表明，通过将 APO2L/TRAIL 与脂质体偶联，生成了大小和脂质组成类似天然外泌体的脂质体，所得的人工外泌体对兔抗原诱导的关节炎具有相当大的治疗作用，抗肿瘤生物活性获得极大提升 [40-41]。另外，Vázquez-Ríos 等 [42] 开发了外泌体模拟物（EM）纳米系统，使脂质体装载了有治疗作用的寡核苷酸，然后用整合素 $\alpha_6\beta_4$ 使其具备肺器官靶向性，特异性地将药物输送至肺腺癌细胞。与天然外泌体相比，EM 表现出与肿瘤源性外泌体相似的肺靶向性和递送效率。

Lin 等 [37] 基于脂质体制造了一种抗肿瘤载体，即人工外泌体，该人工外泌体已在临床应用中验证了其效率和安全性，并进一步由癌膜蛋白修饰，以实现靶向递送。光声成像表明，相比于天然外泌体，人工外泌体在肿瘤组织更早开始累积，进一步表明蛋白质涂层促进了人工外泌体在肿瘤组织中的识别和保留，人工外泌体增强了 NCI-H1299 异种移植模型中的抑制肿瘤生长效果，并且没有明显的不良反应。通过将多种细胞类型的细胞膜蛋白整合到合成磷脂双层中，Zhang 等 [38] 构建了一种人工外泌体 ACES，模拟外泌体的形态和生理组成，在此研究中，ACES 具有来自红细胞（RBC）的抗吞噬能力和来自肿瘤细胞的同源靶向能力，在动物模型中导致药物在肿瘤中蓄积增加、MPS 截留减少和增强抗肿瘤治疗等。此外，为了满足个性化治疗的需求，这种简便的构造策略允许将多个功能集成到 ACES 中，并且人工外泌体容易定制，这可为研究蛋白质功能和细胞内相互作用的提供一个受控系统 [43]。综上，ACES 具有大规模标准化制备、稳定结构、高载药量和定制功能，将在临床应用中提供合适且有前景的外泌体替代物。

3 完善外泌体的储存条件

外泌体的储存也具有非常重要的意义。如果没有合格的存储技术，就无法实现长期存储。因此，有必要开发一种方法，在相对温和的条件下储存外泌体，并且易执行。

环境温度和时间被认为是影响外泌体活力和储存数量的最关键因素，因为外泌体中的生物活性蛋白将随着温度和储存时间的增加而逐渐降解 [44-46]。相反，外泌体中的膜蛋白、DNA 和 RNA 似乎不受储存温度的显著影响 [47-51]。Wu 等 [52] 系统地探索了在不同储存温度下的外泌体性质的变化，发现－ 80 ℃是长期储存的最佳温度。在此温度下可有效抑制生物活性蛋白（包括外泌体）的损失，但在储存过程中，外泌体的性质仍会在一定程度上发生改变 [53]。尽管外泌体在－ 80 ℃下储存时表现出相对稳定性，但在大多数工厂中，在外泌体的制造和运输过程中，这种温度难以达到。因此需要更方便和有效的储存条件。

为了提高外泌体的稳定性，可在原液中引入一些添加剂。例如，将某些蛋白酶抑制剂添加到储存溶液中有助于保护外泌体中的化合物免受降解 [44]。此外，解冻的组合与某些防腐剂如二甲基亚砜（DMSO）、蔗糖和真菌一起使用也有助于提高外泌体的回收率 [54-55]。

冻干，通常用于保存生物活性化合物，现已

被用于外泌体的储存[56]。Charoenviriyakul 等[10]提出一种冻干法以保存外泌体，即在冷冻过程中使用海藻糖作为保护剂，海藻糖可以提供生物保护作用，如稳定蛋白质、细胞膜和脂质体；减少冷冻过程中冰的形成；防止蛋白质以及外泌体的聚集[10]；减少保存过程中 EV 的损失等[57]。然而冻干法保存外泌体的期限以及对于不同类型的外泌体保存的适用性尚不清楚。尽管这种方法有破坏外泌体膜的风险，但当引入保护剂时，它仍然是外泌体储存的有效解决方案[58]。此外，通过引入冷冻保护剂，外泌体可以在室温下储存超过一周，而在数量和生物活性化合物方面损失最小[10]，这种技术的功效与在－ 80 ℃下储存的功效相似。另外，通常用于制备和储存不稳定药物的喷雾干燥方法，也可考虑用于储存外泌体。

值得注意的是，不同来源的外泌体因其异质性，在相同环境下保存的稳定性可能会大有不同[59]。Welch 等[60]研究发现，精液经过长达 30 年的－ 80 ℃冷冻保存后，其外泌体的形状、物理性质、核酸及蛋白含量和种类都没有显著变化。相反，Maroto 等[53]发现，支气管肺泡灌洗液中外泌体冷冻保存样品与新鲜样本相比，体积变大且有一半以上的蛋白质丰度发生变化甚至消失。因此，不同种类来源的外泌体最佳的保存条件仍需探讨。

外泌体存在问题的解决方法与解决效果总结见表 1。

表 1 外泌体存在问题的解决方法与解决效果

Tab 1 Solutions of exosome problems and results

问题		解决方法	解决效果
产量较低		ET	可刺激各类型细胞分泌外泌体[26]
		诱导 KIBRA 过表达	抑制 Rab27a 的蛋白酶降解，增加外泌体的分泌[11]
		与脂质体制剂共孵育	液体涂料强于固体涂料的促分泌效果[27-28]
功能不够全面	杂化外泌体	构建仿生纳米颗粒 HENPs	提高了血液循环中的稳定性[33]
		HEK293FT 细胞来源的外泌体与表达 CRISPR/Cas9 的脂质体杂化	增加药物的递送，避免了 MPS 系统清除[9-35]
		基因工程外泌体与载药热敏脂质体杂化	显著靶向小鼠的同源肿瘤，实现肿瘤部位的优先积累；可负载光热剂，实现光热治疗[31]
	人工外泌体	成纤维细胞来源的外泌体与脂质体杂化	防止吞噬，提高了对成纤维细胞的亲和力[36]
		脂质体与合成 MHC Ⅰ类 / 肽复合物杂化	与天然外泌体大小相近，靶向 T 细胞且促进其增殖[39]
		APO2L/TRAIL 与脂质体偶联	对兔抗原诱导的关节炎具有良好的治疗作用[40]
		改善活性的 Apo2L/TRAIL 与脂质体缀合	克服了人类血液肿瘤细胞的化学耐药性[41]
		EM 纳米系统	具有与肿瘤源性外泌体相似的肺靶向性和递送效率[42]
		癌膜蛋白修饰的脂质体	增强了 NCI-H1299 异种移植模型中抑制肿瘤生长的治疗效果，且无明显的不良反应[37]
		ACES	大规模标准化制备、稳定结构、高载药量和定制功能[38]
缺少标准化的储存条件	原液中加入添加剂	蛋白酶抑制剂	保护外泌体中的化合物免受降解[44]
		DMSO、蔗糖和真菌	提高外泌体的回收率[54-55]
	冻干法	在冷冻过程中加入海藻糖	稳定蛋白质、细胞膜和脂质体；减少冷冻过程中冰的形成；防止蛋白质以及外泌体的聚集，保护外泌体特性；减少分离和保存过程中 EV 的损失[10，57-58]
	根据外泌体来源更换保存条件	精液来源的外泌体－ 80 ℃冷冻保存 30 年	外泌体的形状、物理性质、核酸及蛋白含量和种类均无显著变化[60]
		支气管肺泡灌洗液来源的外泌体冷冻保存	与新鲜样本相比，体积变大且有一半以上蛋白质的丰度发生变化甚至消失[53]

4 前景和展望

外泌体在生物治疗方面具有很大的应用前景，但由于天然外泌体产量低、无标准化外泌体储存方法导致外泌体仅处于初步临床试验阶段，不同来源外泌体存在异质性，相同条件下储存不同源外泌体其稳定性可能大有不同[58]。因此，需要一个标准的制造指南来减少外泌体的异质性。杂化外泌体（外泌体 - 脂质体）和人工外泌体面临的最大挑战包括制备方案、表征和生物相容性问题。将来，结合上述策略的各种组合，可以确定生产所需外泌体的最佳方法。

参考文献

[1] Novick P，Schekman R. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1979，76（4）：1858-1862.

[2] Perin MS，Fried VA，Mignery GA，et al. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C [J]. Nature，1990，345（6272）：260-263.

[3] Hata Y，Slaughter CA，Südhof TC. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin [J]. Nature，1993，366（6453）：347-351.

[4] Cui GN，Liu XP，Hu JR，et al. Research progress on the characteristics of stem cell exosomes [J]. Pharm Today，2020，30（2）：106-109，115.

[5] Colao IL，Corteling R，Bracewell D，et al. Manufacturing preservation of exosomes at room temperature using lyophilization [J]. Int J Pharm，2018，24（3）：242-256.

[6] Kalluri R，LeBleu VS. The biology，function，and biomedical applications of exosomes [J]. Int J Pharm，2020，367（6478）：eaau6977.

[7] Wu Y，Deng W，Klinke DJ. Exosomes：improved methods to characterize their morphology，RNA content，and surface protein biomarkers [J]. Analyst，2015，140（19）：6631-6642.

[8] Sakai-Kato K，Yoshida K，Takechi-Haraya Y，et al. Physicochemical characterization of liposomes that mimic the lipid composition of exosomes for effective intracellular trafficking [J]. Langmuir，2020，36（42）：12735-12744.

[9] Lin Y，Wu J，Gu W，et al. Exosomes-liposome hybrid nanoparticles deliver CRISPR/Cas9 system in MSCs [J]. Adv Sci（Weinh），2018，5（4）：1700611.

[10] Charoenviriyakul C，Takahashi Y，Nishikawa M，et al. Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization [J]. Int J Pharm，2018，553（1-2）：1-7.

[11] Song L，Tang S，Han X，et al. KIBRA controls exosomes secretion via inhibiting the proteasomal degradation of Rab27a [J]. Nat Commun，2019，10（1）：1639.

[12] Lachenal G，Pernet-Gallay K，Chivet M，et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity [J]. Mol Cell Neurosci，2011，46（2）：409-418.

[13] Savina A，Fader CM，Damiani MT，et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner [J]. Traffic，2005，6（2）：131-143.

[14] Ostrowski M，Carmo NB，Krumeich S，et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosomes secretion pathway [J]. Nat Cell Biol，2010，12（1）：19-30.

[15] Raposo G，Stoorvogel W. Extracellular vesicles：exosomes，microvesicles，and friends [J]. J Cell Biol，2013，200（4）：373-383.

[16] Lakkaraju A，Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes：emerging roles in cell and tissue polarity [J]. Trends Cell Biol，2008，18（5）：199-209.

[17] Christ L，Raiborg C，Wenzel EM，et al. Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery [J]. Trends Biochem Sci，2017，42（1）：42-56.

[18] Chiaruttini N，Redondo-Morata L，Colom A，et al. Relaxation of loaded ESCRT-Ⅲ spiral springs drives membrane deformation [J]. Cell，2015，163（4）：866-879.

[19] McCullough J，Clippinger AK，Talledge N，et al. Structure and membrane remodeling activity of ESCRT-Ⅲ helical polymers [J]. Science，2015，350（6267）：1548-1551.

[20] Lee IH，Kai H，Carlson L，et al. Negative membrane curvature catalyzes nucleation of endosomal sorting complex required for transport（ESCRT）-Ⅲ assembly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2015，112（52）：15892-15897.

[21] Rajkovic K，Hsu C，Chiantia S，et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J]. Science，2008，319（5867）：1244-1247.

[22] Kajimoto T，Okada T，Miya S，et al. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes [J]. Nat Commun，2013，4：2712.

[23] Theos AC，Truschel ST，Tenza D，et al. A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intralumenal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis [J]. Dev Cell，2006，10（3）：343-354.

[24] van Niel G，Charrin S，Simoes，et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis [J]. Dev Cell，2011，21（4）：708-721.

[25] Haraszti RA，Miller R，Stoppato M，et al. Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity [J]. Mol Ther，2018，26（12）：2838-2847.

[26] Fukuta T，Nishikawa A，Kogure K. Low level electricity increases the secretion of extracellular vesicles from cultured cells [J]. Biochem Biophys Rep，2019，21：100713.

[27] Emam SE，Ando H，Abu Lila AS，et al. A novel strategy to increase the yield of exosomes（extracellular vesicles）for an expansion of basic research [J]. Biol Pharm Bull，2018，41（5）：733-742.

[28] Emam SE，Ando H，Lila ASA，et al. Liposome co-incubation with cancer cells secreted exosomes（extracellular vesicles）with different proteins expressions and different uptake pathways [J]. Sci Rep，2018，8（1）：14493.

[29] Belhadj Z，He B，Deng H，et al. A combined “eat me/don’t eat me” strategy based on extracellular vesicles for anticancer nanomedicine [J]. J Extracell Vesicles，2020，9（1）：1806444.

[30] Pan S，Zhang Y，Huang M，et al. Urinary exosomes-based engineered nano vectors for homologously targeted chemo-chemodynamic prostate cancer therapy via abrogating EGFR/AKT/NF-kB/IkB signaling [J]. Biomaterials，2021，275：120946.

[32] Piffoux M，Silva AKA，Wilhelm C，et al. Modification of extracellular vesicles by fusion with liposomes for the design of personalized biogenic drug delivery systems [J]. ACS Nano，2018，12（7）：6830-6842.

[33] Li L，He D，Guo Q，et al. Exosomes-liposome hybrid nanoparticle codelivery of TP and miR497 conspicuously overcomes chemoresistant ovarian cancer [J]. J Nanobiotechnology，2022，20（1）：50.
[34] Li YJ，Wu JY，Liu J，et al. Artificial exosomes for translational nanomedicine [J]. J Nanobiotechnol，2021，19（1）：242.
[35] Lv Q，Cheng L，Lu Y，et al. Thermosensitive exosomes-liposome hybrid nanoparticle-mediated chemoimmunotherapy for improved treatment of metastatic peritoneal cancer [J]. Adv Sci（Weinh），2020，7（18）：2000515.
[31] Cheng L，Zhang X，Tang J，et al. Gene-engineered exosomes-thermosensitive liposomes hybrid nanovesicles by the blockade of CD47 signal for combined photothermal therapy and cancer immunotherapy [J]. Biomaterials，2021，275：120964.
[36] Sun L，Fan M，Huang D，et al. Clodronate-loaded liposomal and fibroblast-derived exosomal hybrid system for enhanced drug delivery to pulmonary fibrosis [J]. Biomaterials，2021，271：120761.
[37] Lin Y，Li S，Xiao Z，et al. Epigenetic inhibition assisted chemotherapeutic treatment of lung cancer based on artificial exosomes [J]. Pharmacol Res，2021，171：105787.
[38] Zhang KL，Wang YJ，Sun J，et al. Artificial chimeric exosomes for anti-phagocytosis and targeted cancer therapy [J]. Chem Sci，2018，10（5）：1555-1561.
[39] De La Peña H，Madrigal JA，Rusakiewicz S，et al. Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology [J]. J Immunol Methods，2009，344（2）：121-132.
[40] Martinez-Lostao L，García-Alvarez F，Basáñez G，et al. Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum，2010，62（8）：2272-2282.
[41] De Miguel D，Basáñez G，Sánchez D，et al. Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells [J]. Mol Pharm，2013，10（3）：893-904.
[42] Vázquez-Ríos AJ，Molina-Crespo Á，Bouzo BL，et al. Exosomes-mimetic nanoplatforms for targeted cancer drug delivery [J]. J Nanobiotechnol，2019，17（1）：85.
[43] Kooijmans SA，Vader P，van Dommelen SM，et al. Exosomes mimetics：a novel class of drug delivery systems [J]. Int J Nanomedicine，2012，7：1525-1541.
[44] Oosthuyzen W，Sime NE，Ivy JR，et al. Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis [J]. J Physiol，2013，591（23）：5833-5842.
[45] Welch JL，Madison MN，Margolick JB，et al. Effect of prolonged freezing of semen on exosomes recovery and biologic activity [J]. Sci Rep，2017，7：45034.
[46] Jeyaram A，Jay SM. Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications [J]. AAPS J，2017，20（1）：1.
[47] Qin B，Zhang Q，Hu XM，et al. How does temperature play a role in the storage of extracellular vesicles [J]. Cell Physiol，2020，235（11）：7663-7680.
[48] Zonneveld MI，Brisson AR，van Herwijnen MJ，et al. Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures [J]. J Extracell Vesicles，2014，14：3.
[49] Ge Q，Zhou Y，Lu J，et al. miRNA in plasma exosomes is stable under different storage conditions [J]. Molecules，2014，19（2）：1568-1575.
[50] Sarker S，Scholz-Romero K，Perez A，et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy [J]. Transl Med，2014，12：204.
[51] Jin Y，Chen K，Wang Z，et al. DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions [J]. BMC Cancer，2016，16（1）：753.
[52] Wu Z，He D，Li H. Bioglass enhances the production of exosomes and improves their capability of promoting vascularization [J]. Bioact Mater，2020，6（3）：823-835.
[53] Maroto R，Zhao Y，Jamaluddin M，et al. Effects of storage temperature on airway exosomes integrity for diagnostic and functional analyses [J]. Extracell Vesicles，2017，6（1）：1359478.
[54] Zhou H，Yuen PS，Pisitkun T，et al. Collection，storage，preservation，and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery [J]. Kidney Int，2006，69（8）：1471-1476.
[55] Tegegn TZ，De Paoli SH，Orecna M，et al. Characterization of procoagulant extracellular vesicles and platelet membrane disintegration in DMSO-cryopreserved platelets [J]. J Extracell Vesicles，2016，5：30422.
[56] El-Nesr OH，Yahiya SA，El-Gazayerly ON. Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes [J]. Saudi Pharm J，2010，18（4）：217-224.
[57] Bosch S，de Beaurepaire L，Allard M，et al. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage [J]. Sci Rep，2016，6：36162.
[58] Bahr MM，Amer MS，Abo-El-Sooud K，et al. Preservation techniques of stem cells extracellular vesicles：a gate for manufacturing of clinical grade therapeutic extracellular vesicles and long-term clinical trials [J]. Int J Vet Sci Med，2020，8（1）：1-8.
[59] Kowal J，Arras G，Colombo M，et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2016，113（8）：E968-977.
[60] Welch JL，Madison MN，Margolick JB，et al. Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity [J]. Sci Rep，2017，7：45034.

（收稿日期：2022-10-20；修回日期：2022-12-08）

胆固醇结晶相关的疾病以及消除结晶的治疗策略

张杰[1]，杨求胜[1]，彭旭聪[1]，樊星辉[1]，陈青[1]，舒新华[1, 2]，谭周进[3]，刘敏卓[1*]，曾志红[1*]（1. 长沙学院生物与化学工程学院，长沙　410022；2. 格拉斯哥卡利多尼安大学，英国　格拉斯哥　G4 0BA；3. 湖南中医药大学医学院，长沙　410208）

摘要：胆固醇是构成细胞膜的重要组成成分，也是人体内类固醇激素和胆汁酸等多种重要物质的合成原料。但是胆固醇水溶性极低，在吸收、代谢和排泄过程中易发生异常而结晶，导致各种疾病。本文归纳了体内胆固醇结晶导致的动脉粥样硬化、胆结石、老年性黄斑等疾病的特点，以及临床上或者研究中针对消除胆固醇结晶所采取的治疗措施，以期为抑制或者消除胆固醇结晶从而治疗胆固醇结晶相关疾病提供理论依据和参考。

关键词：胆固醇结晶；动脉粥样硬化；胆结石；老年性黄斑；治疗策略

中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1883-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.031

Cholesterol crystals related diseases and elimination strategies

ZHANG Jie[1], YANG Qiu-sheng[1], PENG Xu-cong[1], FAN Xing-hui[1], CHEN Qing[1], SHU Xin-hua[1, 2], TAN Zhou-jin[3], LIU Min-zhuo[1*], ZENG Zhi-hong[1*] (1. *College of Biological and Chemical Engineering*, *Changsha University*, *Changsha*　410022; 2. *Department of Biological and Biomedical Sciences and Vision Science*, *Glasgow Caledonian University*, *Glasgow　UK*　G4 0BA; 3. *Medical School*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha*　410208)

Abstract: Cholesterol plays a crucial role in the human body as a precursor of steroid hormones and bile acids, in addition to forming the structure of cell membranes. Since cholesterol is insoluble in water, it may be crystallized during the ingestion, synthesis, absorption, and excretion of cholesterol, and then cause many diseases. We reviewed the formation and characteristics of cholesterol crystals in atherosclerosis, gallstones, and age-related macular degeneration, and strategies of inhibiting or removing cholesterol crystals in clinical or experimental study. This review aims to provide theoretical basis and reference for the strategies of inhibiting or removing cholesterol crystals in cholesterol crystal related diseases.

Key words: cholesterol crystal; atherosclerosis; gallstone; age-related macular degeneration; treatment strategy

胆固醇是人体的重要组成成分，是构成细胞膜的重要成分，也是合成人体多种重要物质的原料，参与类固醇如胆汁酸、肾上腺皮质激素、雌性激素、雄性激素、维生素 D_3 等物质的合成，也参与人体内糖分、脂肪、蛋白质的代谢过程[1]。当胆固醇在体内吸收、分布、代谢和排泄过程中出现异常，有可能导致体内游离胆固醇浓度发生变化，而当游离胆固醇浓度升高，超出其溶解度时，可引起胆固醇结晶[2]。胆固醇结晶在多种疾病，例如动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）和胆结石等疾病进展中扮演重要的角色[3-5]。因此，研究胆固醇结晶的机制，进而避免体内胆固醇结晶以及消除胆固醇结晶是预防和治疗这类疾病的重要研究方向[4, 6-7]。本文将介绍几种胆固醇结晶

基金项目：湖南省重点研发计划项目（No. 2022WK2008）；湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ30761）；长沙市科技局项目（No. kq2203002）；湖南省教育厅资助科研项目（No. 22B0820，No. 22A0596）。

作者简介：张杰，男，博士，助理研究员，主要从事物理药剂学、无定形态药物结晶方面的研究，email：zhangjie448215@163.com

[*]**通信作者：**刘敏卓，男，博士，讲师，主要从事天然产物提取和分离方面的研究，email：120691761@qq.com；曾志红，男，博士，教授，主要从事抗老年性黄斑变性药物开发方面的研究，email：z20181201@ccsu.edu.cn

引起的疾病 [动脉粥样硬化、胆固醇胆结石、老年性黄斑变性（age-related macular degeneration，AMD）及其他疾病]，对各相关疾病的产生原因以及与胆固醇结晶之间的关系进行阐述，同时介绍目前临床以及研究中关于抑制和消除胆固醇结晶的相关策略和方法，如表 1 所示。

表 1 胆固醇结晶相关的疾病以及抑制和消除结晶的治疗策略

Tab 1 Cholesterol crystal related diseases and inhibition and elimination strategies

胆固醇代谢异常相关疾病	是否发生胆固醇结晶	抑制和消除结晶的策略
动脉粥样硬化	是	他汀类药物；环糊精以及相关制剂
胆固醇胆结石	是	手术去除；胆酸盐；大蒜、洋葱和瓜尔豆等食物
老年性黄斑变性	是	暂无明确消除胆固醇结晶策略
Niemann-Pick 病	是	环糊精
阿尔茨海默病	目前无明确证据	无
胆固醇皮下结晶	是	手术去除

1 动脉粥样硬化

1.1 胆固醇结晶与动脉粥样硬化疾病形成

胆固醇经过消化道吸收进入体内后，主要依靠低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）转运到肝外组织细胞，以满足细胞对胆固醇的需求。然而在转运过程中，胆固醇有可能结晶，继而引发动脉粥样硬化。动脉粥样硬化可诱发多种心血管疾病，其中冠状动脉粥样硬化引起的心肌梗死以及脑动脉粥样硬化引起的脑梗死危害最大，病死率最高 [8-9]。大量研究表明，胆固醇结晶是动脉粥样硬化斑块形成过程中的关键因素和重要组成部分 [10-11]。已有研究报道，初期形成的斑块含有胆固醇晶体，而胆固醇结晶具有促进炎症反应的作用，可加速斑块形成以及脱落 [11]。

胆固醇在血液的转运过程中以胆固醇酯的形式存在，含有胆固醇酯的 LDL 通过胞饮或者清道夫受体（scavenger receptor，SR）胞吞等途径被巨噬细胞和血管平滑肌细胞吸收。进入细胞内的胆固醇酯经胆固醇酯水解酶水解成游离胆固醇，而游离胆固醇则可通过胆固醇酰基转移酶 1（acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase 1，ACAT-1）转变成胆固醇酯。细胞内游离胆固醇也可通过 ATP 结合盒转运体 A1（ATP-binding cassette transporter A1，ABCA1）、ATP 结合盒转运体 G1（ATP-binding cassette transporter G1，ABCG1）、清道夫受体 B1（SR-B1）外排至细胞外，与高密度脂蛋白（high density lipoprotein，HDL）结合逆转运至肝脏进行代谢和排泄。在正常情况下，细胞内的胆固醇酯和游离胆固醇处于动态平衡，而当胆固醇被细胞摄入与逆转运到细胞外的过程发生异常，该平衡被打破，游离胆固醇浓度超过溶解度形成过饱和状态，导致胆固醇结晶。胆固醇从溶液状态发生结晶会导致细胞体积膨胀和细胞死亡，也是引起动脉粥样硬化的斑块的形成因素之一 [12]。此外，结晶引起的体积膨胀还会导致动脉壁的物理损伤和炎症反应 [13]。同时，胆固醇结晶还可作为第二信号分子诱导巨噬细胞产生 NOD 样受体蛋白 3（nod-like receptor related protein，NLRP3）炎症小体，导致促炎因子白细胞介素 -1β（interleukin-1β，IL-1β）分泌增加，促进炎症发展 [14]。尖锐的胆固醇结晶体，特别是针状晶体可刺穿斑块纤维帽，导致斑块不稳定，易于脱落，形成血栓 [15-16]。胆固醇晶体在动脉粥样硬化形成过程中的作用如图 1 所示。

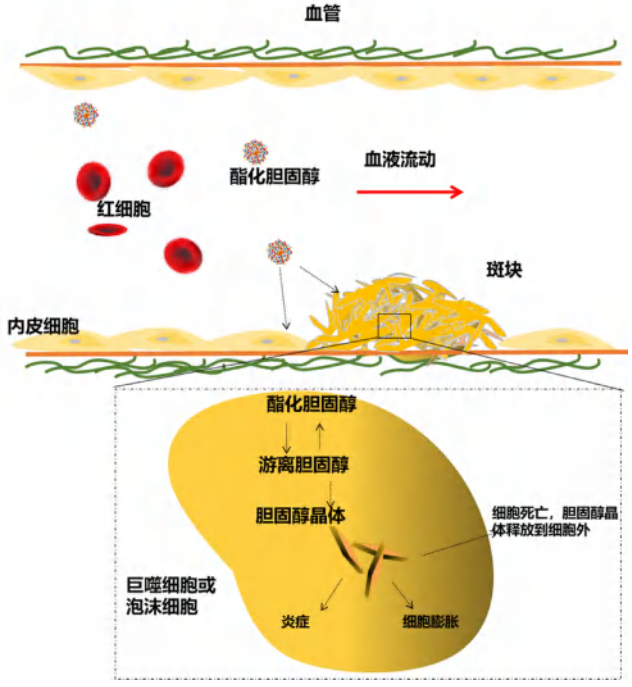


图 1 胆固醇晶体参与动脉粥样硬化疾病形成的机制示意图

Fig 1 Mechanism of cholesterol crystals in the progression of atherosclerosis

1.2 动脉粥样硬化疾病治疗中消除胆固醇结晶的策略

胆固醇结晶在动脉粥样硬化疾病发展过程中扮演重要角色，因此可针对抑制胆固醇结晶开发相应的治疗策略 [17]。

1.2.1 抑制胆固醇结晶生成　由于游离胆固醇浓度升高导致的胆固醇结晶，而引发了动脉粥样硬化，根据胆固醇体内过程，可以通过抑制胆固醇生成可有效降低胆固醇浓度，抑制胆固醇过饱和溶液形成从而抑制胆固醇结晶。他汀类药物是

目前临床上应用最广泛的降脂药物，通过抑制胆固醇合成限速酶 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）的活性，减少胆固醇生成，从而降低胆固醇浓度。已有研究证明，他汀类药物还能改变胆固醇晶体形貌和胆固醇结晶行为，添加了他汀类药物的胆固醇溶液结晶体积膨胀率更小，同时尖锐的胆固醇晶体变钝 [12]。美国食品药品监督管理局（FDA）于 2020 年批准上市了新型治疗高血脂的药物贝派度酸（bempedoic acid），该药作用于 HMG-CoA 上游，为 ATP- 柠檬酸裂解酶（ATP-citrate lyase，ACL）抑制剂，减少胆固醇合成，降低血液中胆固醇的含量 [18-19]；但是贝派度酸对胆固醇晶体形成和消除的影响，目前并无文献报道。此外，前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9，PCSK9）抑制剂也是在临床上广泛应用的降脂药物，它通过提高肝细胞表面的 LDL 受体数量，增加血液中 LDL 的转化，从而降低血液中 LDL 的水平，达到降血脂的作用。与贝派度酸类似，目前尚无关于 PCSK9 抑制剂对胆固醇晶体形成和消除的影响的报道 [20]。

1.2.2 溶解胆固醇晶体 对于动脉粥样硬化斑块中已经存在的胆固醇结晶，可通过增溶的方法清除。体外实验表明，当鹅去氧胆酸盐和熊去氧胆酸盐超过临界胶束浓度时，对胆固醇结晶都具有溶解作用，其中鹅去氧胆酸盐表现出更好的体外溶解特性 [21]。熊去氧胆酸盐在临床中被广泛用于胆固醇性胆结石的治疗，但对动脉粥样硬化的作用尚无相关临床试验报道 [22]。

环糊精具有良好的溶解胆固醇晶体的能力，被广泛用于治疗动脉粥样硬化 [23-24]。环糊精通常含有 6 ～ 12 个 *D*- 吡喃葡萄糖单元，其中最常用的为含有 7 个葡萄糖单元的分子，也叫作 *β*- 环状糊精，其含有一个尺寸为 6.0 ～ 6.5Å 的分子空腔，可以用来包合药物，提高药物的溶解度 [25-26]。Kim 等 [27] 先将甲基 -*β*- 环糊精和辛伐他汀制备成包合物，然后再与磷脂壳组成纳米制剂，该制剂到达病变部位，由于胆固醇对环糊精的亲和力高于他汀类药物，因此释放他汀类药物，而游离的甲基 -*β*- 环糊精通过包合胆固醇分子，溶解胆固醇结晶，达到协同治疗的目的。Yan 等 [28] 采用多聚 -*β*- 环糊精（pCD）与苯并咪唑（BM）接枝的硫酸葡聚糖构建 pH 敏感开关（pBM）的超分子纳米组装体（pCD/pBM-SNA）。该组装体的 CD 腔可以在 pH 7.4 下被疏水 BM 有效密封。pCD/pBM-SNA 进入溶酶体后，由于 BM 的质子化作用而解体，恢复环糊精腔，将胆固醇晶体溶解为游离胆固醇，并增强胆固醇外排，促进动脉粥样硬化斑块的消退。然而环糊精治疗动脉粥样硬化尚停留在实验室研究水平，将其作为治疗动脉粥样硬化的新药或者药物载体还需进一步研究。

众多中药活性单体具有治疗动脉粥样硬化的能力，例如黄连素、黄芩素、姜黄素等 [29-31]。中药活性单体治疗动脉粥样硬化基于干预各种抗炎通路和抗氧化机制。筛选具有抑制胆固醇成核结晶或者溶解胆固醇晶体能力的中药活性单体，值得进一步挖掘。

胆固醇结晶一旦生成，将对机体产生不可逆的损害，所以应该尽早发现并尽快消除晶体，减轻炎症和细胞死亡。消除动脉粥样硬化斑块中的胆固醇结晶，还需要考虑晶体或者斑块脱落进入血液循环造成血管堵塞。

2 胆固醇胆结石

2.1 胆固醇结晶与胆结石之间的关系

胆固醇在体内代谢，主要通过肝脏代谢生成胆汁酸，以胆汁形式排入肠道，乳化食物中的脂质。胆固醇在代谢过程中发生异常，引起胆固醇浓度过高，则可能生成胆结石。胆结石病是最常见的胃肠道疾病之一，在成年人群中的患病率为 10% ～ 15%[32]，根据结石的化学成分可分为胆固醇性胆结石、胆红素结石和混合性结石 [33]。胆囊内形成结石后，可刺激胆囊黏膜，不仅可引起胆囊的慢性炎症，而且当结石嵌顿在胆囊颈部或胆囊管后，还可以引起继发感染，导致胆囊的急性炎症 [32]。此外，结石对胆囊黏膜的慢性刺激，还可能导致胆囊癌的发生 [32]。

胆固醇胆结石几乎完全在胆囊中形成，因此胆囊的微观环境变化对胆结石形成至关重要。胆固醇性胆结石可能与胆囊内胆固醇的浓度和性质改变有关。胆固醇结晶形成过程如图 2 所示。胆汁中的胆固醇过饱和引起胆固醇结晶是胆固醇结石形成的第一步 [33-35]。为了验证胆固醇结晶与胆结石形成的关系，Sedaghat 等 [3] 通过十二指肠插管法对 54 例患者（8 例无症状胆结石）进行了胆囊胆汁检查，研究分析胆汁样品中是否出现胆固醇晶体，并建立与胆固醇饱和度的百分比之间的关系。结果显示 8 例无症状胆结石患者的胆汁的胆固醇饱和度为（142±42）%，其中 5 例患者出现晶体。其他患者中，36 例为过饱和胆汁 [胆固醇饱和度为（166±44）%]，10 例为不饱和胆汁 [胆固醇饱和度为（81±24）%]。在 26 例有症状的胆结石患者中，7 例胆红素结石患者的胆汁中未观察到晶体，但在其他 19 例胆固醇性胆结石患者的胆汁中均存在胆固醇晶体，提示胆固醇结

晶可能是形成胆固醇性胆结石的重要因素。

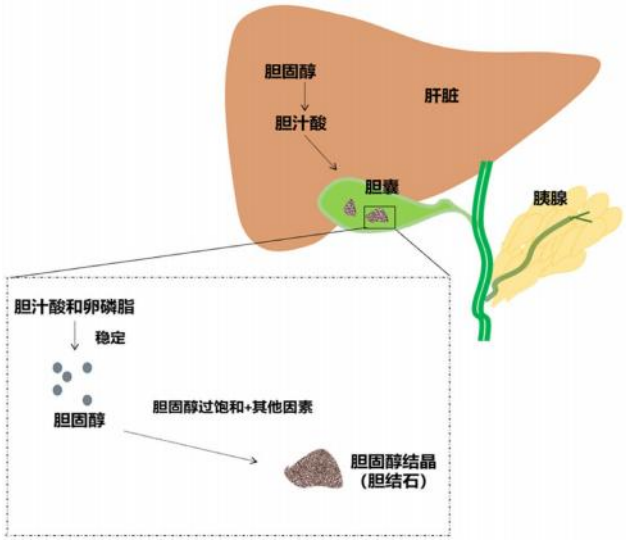


图 2 胆固醇胆结石形成的过程和影响因素

Fig 2 Role of cholesterol crystals in the progression of cholesterol gallstone and influence factors

2.2 胆结石治疗中抑制和消除胆固醇结晶的策略

对于已经有腹痛和腹胀等临床症状的胆结石患者，需要通过手术进行治疗；而对无症状的结石患者，除了手术治疗还可采用药物治疗 [36]。胆汁中的胆固醇增溶是一个复杂的过程，其中胆汁的其他主要成分——胆汁盐和磷脂起着至关重要的作用，是调节胆固醇结晶的关键因素 [32]。早在 20 世纪 Nakagawa[36] 就发表了关于熊去氧胆酸治疗胆结石的研究，显示了很好的治疗效果，而且熊去氧胆酸没有肝毒性，是目前临床上应用广泛的治疗胆结石的药物。体外实验研究胆酸盐对胆结石溶解的机制时发现，当鹅去氧胆酸盐和熊去氧胆酸盐超过临界胶束浓度时，对胆固醇结晶都具有溶解作用，其中鹅去氧胆酸盐表现出更好的体外溶解特性 [21]。

胆汁中其他成分对胆固醇结晶也有影响，例如载脂蛋白和黏蛋白等 [37]。有研究显示通过改变特定蛋白含量可以调控胆固醇结晶的成核时间，在一项大鼠实验中发现，食用大蒜和洋葱具有抗胆结石的潜力：将喂养致结石饲料的大鼠胆汁和含大蒜 / 洋葱饲料喂养的大鼠胆汁进行混合，胆固醇结晶成核时间延长，结果显示喂养致结石饲料组的大鼠胆汁中低分子量蛋白可促进胆固醇晶体生长，而喂养大蒜和洋葱组的大鼠中胆汁中低分子量蛋白能有效抑制胆固醇晶体的生长 [38]。在另外一项研究中发现瓜尔豆具有抗胆结石的潜力，通过改变大鼠胆汁中高分子量和低分子量蛋白的含量影响胆汁中胆固醇过饱和度指数，进而影响胆固醇结晶 [38]。上述数据表明，除了胆道胆固醇饱和浓度对胆固醇结晶有影响外，还存在影响胆固醇成核和结晶的蛋白因子，而通过饮食或者药物调控这些因子可以达到调控胆固醇结晶的目的 [39]。对于胆固醇结石的高风险患者，提前干预，避免胆固醇结晶成核，预防结石的形成，相比患者已经形成胆结石再进行结石溶解，具有更大的临床获益。此外，很多食物在动物实验中被证明了对胆固醇结晶的成核具有很好的抑制作用，可以有效抑制胆固醇结晶结石的形成，因此开发药食同源的食物，对胆固醇胆结石的预防和治疗有重要意义。

3 老年性黄斑变性

3.1 胆固醇结晶与老年性黄斑变性形成

胆固醇在体内的转运过程中，局部胆固醇过饱和情况除了引起动脉粥样硬化以外，也可引起老年性黄斑变性 [40-41]。老年性黄斑变性是一种复杂的眼部疾病，其特征在于感光细胞的死亡以及视网膜色素上皮（retinal pigment epithelium，RPE）和脉络膜毛细血管层（choriocapillaris，CC）的退化 [42]。临床上可分为湿性黄斑变性和干性黄斑变性，干性老年性黄斑变性占 85% ～ 90%。随着人口老龄化的加剧，老年性黄斑变性的发病率呈逐年上升的趋势 [43]。老年性黄斑变性的发病机制尚不明确，一般认为由多因素综合影响所致，如遗传因素、视网膜慢性光损害、叶黄素缺失等 [43]。

一项疾病危险因素分析显示，动脉粥样硬化是老年性黄斑变性最相关的危险因素 [40]，提示了两种疾病之间的联系。有研究报道老年性黄斑变性患者的视网膜色素上皮处超反射线代表胆固醇结晶 [44]。Pang 等 [45] 采用光学相干断层扫描技术（spectral-domain optical coherence tomography，OCT）证实老年性黄斑变性患者的视网膜色素上皮底的玻璃膜疣含有胆固醇结晶，而玻璃膜疣形成是老年性黄斑变性的早期标志。

3.2 老年性黄斑变性疾病治疗中抑制和消除胆固醇结晶的策略

对于湿性老年性黄斑变性，抗血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）的药物雷珠单抗和阿柏西普等可通过抑制新生血管生成，降低血管通透性，达到促进视网膜内渗液快速吸收并改善患者视觉质量 [46]。而对于干性老年性黄斑变性，临床上至今仍没有特效的药物治疗老年性黄斑变性 [46]。目前的治疗仅仅起到延缓老年性黄斑变性进展的临床效果，例如口服抗氧化剂维生素 C、维生素 E、叶黄素等视网膜组织营养剂，通过减少自由基对视网膜色素上皮细胞的损害，保护感光细胞、视锥细胞 [47]。

由于动脉粥样硬化与老年性黄斑变性都与胆固醇代谢异常密切相关，而他汀类药物在治疗动脉粥样硬化中，对调控脂质异常代谢具有显著疗效，已有大量的研究利用他汀类药物治疗老年性黄斑变性[48-51]。他汀类药物可以降低视网膜色素上皮细胞 Bruch 膜的脂质沉积，同时还具有抗氧化和抗炎作用，降低氧化低密度脂蛋白 ox-LDL 水平[51]。Tian 等[52]研究发现阿托伐他汀可以增加视网膜上皮细胞膜的流动性从而维持视网膜上皮细胞的吞噬清洁功能，同时也可以修复胆固醇结晶损伤导致的视网膜上皮细胞的吞噬功能。其他他汀类药物，例如洛伐他汀和辛伐他汀也都表现了出了阿托伐他汀类似的效果。虽然他汀类药物在治疗老年性黄斑变性显示良好潜力，但是目前临床上并不推荐直接使用他汀类药物进行治疗，因此需要更多的临床试验进行证明[51]。

此外，Biswas 等[53-54]研究发现视网膜上皮细胞中线粒体膜 18 kDa 转位蛋白（targeting mitochondrial 18 kDa translocator protein，TSPO 18 kDa）参与胆固醇转运。进一步研究发现，抗焦虑症老药依替福辛靶向 TSPO，促进胆固醇代谢和转运外排，可作为潜在治疗老年性黄斑变性的药物[54]。TSPO 等针对胆固醇转运和代谢的靶点的发现和开发，有助于开发新的治疗老年性黄斑变性的药物，或者开发治疗其他疾病的药物，达到老药新用的目的。但目前相关的研究仅在动物和细胞水平验证，且主要关注血液或细胞中胆固醇浓度，对病症相关的胆固醇结晶有待进一步研究[54]。中药活性成分也被广泛报道用于治疗老年性黄斑变性，主要利用中药抗氧化、抗炎、抗衰老和抗凋亡生物活性[55]。例如，在人视网膜色素上皮细胞模型中，绞股蓝皂苷可以上调胆固醇转运和代谢的基因，从而促进胆固醇外排，同时还能抑制 ox-LDL 诱导的氧化应激和炎症，因此绞股蓝皂苷有潜力成为治疗老年性黄斑变性的药物[56]。针对老年性黄斑变性相关的胆固醇结晶，开发眼部局部制剂消除结晶，改善患者视力，是后续研究可重点考虑的方向之一。

4 其他与胆固醇结晶相关的疾病以及治疗策略

4.1 C- 型 Niemann-Pick 病

胆固醇代谢相关基因突变有可能导致胆固醇代谢异常从而引发胆固醇结晶，例如 C 型 Niemann-Pick 病（Niemann-Pick disease type C，NPC）是常染色体隐性遗传疾病，约 95% 患者 18 号染色体 NPC1 基因突变，少部分 14 号染色体的 NPC2（HEl）突变。NPC 基因突变引起脂质代谢异常，导致大量游离胆固醇和鞘脂类沉积在溶酶体和内涵体中，从而累及肝、脾、脑等多脏器病变。目前对于 C 型 Niemann-Pick 病仍然缺乏有效的治疗。环糊精被广泛研究用于治疗动脉粥样硬化，因为其具有溶解胆固醇晶体的能力[23，27]。Rosenbaum 等[57]在细胞和动物水平发现环糊精对 C 型 Niemann-Pick 病有潜在的治疗效果。用环糊精短暂处理的细胞会使胆固醇酯化增加，向内质网的胆固醇传递增加。环糊精介导的胆固醇从内吞系统的转运增强可以减少胆固醇在 NPC1 或 NPC2 缺陷细胞中的积累。研究还发现甲基 -β- 环糊精比羟丙基 -β- 环糊精在减少 NPC 突变细胞中胆固醇结晶积累方面更有效，形成的胆固醇结晶更少[57]。对该类疾病患者，采用基因治疗是根治的最优策略，对胆固醇结晶进行消除，属于对症治疗，目前临床上还无针对性的治疗药物。

4.2 阿尔茨海默病

阿尔茨海默病与胆固醇代谢也有关联[58]，研究发现 β- 淀粉样蛋白是构成老年斑的主要物质，而细胞膜中的胆固醇是淀粉样蛋白聚集的诱因[59]。Wang 等[60]也发现了胆固醇与阿尔茨海默病之间的联系，抑制星形胶质细胞胆固醇的生成可减少 β- 淀粉样蛋白的产生，从而阻止阿尔茨海默病的发展。但胆固醇结晶是否存在于阿尔茨海默病患者的病灶中，有待进一步研究，目前尚无针对性的药物治疗策略。

4.3 胆固醇皮下结晶

此外，身体其他部位也有可能产生胆固醇结晶，例如，许凤丽等[61]报道了 1 例胆固醇皮下结晶，患者左侧臀部皮下有一个约豌豆大小的结节，质硬，活动度差，组织病理示胆固醇结晶。该患者的胆固醇结节最终予以手术切除，口服降脂药物进行治疗后无复发。但该病的报道并不常见，而且机制并未进行深入探讨，目前尚无相关的药物治疗策略。

5 结论与展望

多种疾病与胆固醇代谢异常相关，胆固醇代谢异常可导致胆固醇结晶，而结晶又加重疾病进展。抑制和消除胆固醇结晶，是治疗与胆固醇结晶相关疾病的常用方法。胆固醇结晶包括成核与晶体生长，避免成核可以有效避免结晶产生，可从源头上进行治疗，从根本上避免晶体对机体的损害，而抑制晶体生长，可以延缓疾病的进展。目前临床上他汀类药物抑制胆固醇的生成，对动脉粥样硬化具有良好的治疗效果，而熊去氧胆酸对胆固醇胆结石具有较好的消除作用。针对不同疾病中的胆固醇结晶，需要不同的药物治疗，可能与特定疾病发病机制和发生部位微观环境有

关。不同疾病之间的药物治疗策略是否可以借鉴和参考，达到老药新用的目标，值得深入研究。此外，中药活性单体成分在抗炎等方面体现出较好的效果，而抗炎治疗，主要针对胆固醇结晶形成后对细胞以及组织造成的炎症反应。筛选抑制和消除胆固醇结晶的中药活性成分，应用中药活性单体成分与现有的治疗药物进行联合，可能达到意想不到的效果。消除胆固醇结晶过程中，胆固醇结晶可能发生脱落而造成栓塞等其他危害，需要在治疗过程中予以关注。

参考文献

[1] Morgan AE，Mooney KM，Wilkinson SJ，et al. Cholesterol metabolism：a review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation [J]. Ageing Res Rev，2016，27：108-124.

[2] Varsano N，Capua-Shenkar J，Leiserowitz L，et al. Crystalline cholesterol：the material and its assembly lines [J]. Annu Rev Mater Res，2022，52（1）：57-58.

[3] Sedaghat A. Cholesterol crystals and the formation of cholesterol gallstones [J]. N Engl J Med，1980，302（23）：1274-1277.

[4] Baumer Y，McCurdy S，Weatherby TM，et al. Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis [J]. Nat Commun，2017，8（1）：1129.

[5] Chen YPB. Cholesterol crystals impede nerve repair [J]. Science，2018，359（6375）：635-636.

[6] Baumer Y，Mehta NN，Dey AK，et al. Cholesterol crystals and atherosclerosis [J]. Eur Heart J，2020，41（24）：2236-2239.

[7] Shepelenko M，Hirsch A，Varsano N，et al. Polymorphism，structure，and nucleation of cholesterol. H2O at aqueous interfaces and in pathological media：revisited from a computational perspective [J]. J Am Chem Soc，2022，144（12）：5304-5314.

[8] Kobiyama K，Ley K. Atherosclerosis [J]. Circ Res，2018，123（10）：1118-1120.

[9] Ntaios G，Wintermark M，Michel P. Supracardiac atherosclerosis in embolic stroke of undetermined source：the underestimated source [J]. Eur Heart J，2021，42（18）：1789-1796.

[10] Varsano N，Beghi F，Elad N，et al. Two polymorphic cholesterol monohydrate crystal structures form in macrophage culture models of atherosclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci，2018，115（30）：7662-7669.

[11] Duewell P，Kono H，Rayner KJ，et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. Nature，2010，464（7293）：1357-1361.

[12] Abela GS，Vedre A，Janoudi A，et al. Effect of statins on cholesterol crystallization and atherosclerotic plaque stabilization [J]. Am J Cardiol，2011，107（12）：1710-1717.

[13] Grebe A，Latz E. Cholesterol crystals and inflammation [J]. Curr Rheumatol Rep，2013，15（3）：313.

[14] Janoudi A，Shamoun FE，Kalavakunta JK，et al. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque [J]. Eur Heart J，2016，37（25）：1959-1967.

[15] Abela GS. Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic inflammation [J]. J Clin Lipidol，2010，4（3）：156-164.

[16] Al-Handawi MB，Commins P，Karothu DP，et al. Mechanical and crystallographic analysis of cholesterol crystals puncturing biological membranes [J]. Chemistry，2018，24（44）：11493-11497.

[17] 莫芮，陈松，苏志桂 . 清除斑块胆固醇结晶治疗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 药学研究，2021，40（1）：52-67.

[18] Markham A. Bempedoic acid：first approval [J]. Drugs，2020，80（7）：747-753.

[19] Lalwani ND，Hanselman JC，MacDougall DE，et al. Complementary low-density lipoprotein-cholesterol lowering and pharmacokinetics of adding bempedoic acid（ETC-1002）to high-dose atorvastatin background therapy in hypercholesterolemic patients：a randomized placebo-controlled trial [J]. J Clin Lipidol，2019，13（4）：568-579.

[20] 丘岳，黄晓青，黄振光 . PCSK9 抑制剂在动脉粥样硬化性心血管疾病的应用现状与展望 [J]. 中南药学，2021，19（7）：1353-1357.

[21] Abendan RS，Swift JA. Cholesterol monohydrate dissolution in the presence of bile acid salts [J]. Cryst Growth Des，2013，13（8）：3596-3602.

[22] Chung J，An SH，Kang SW，et al. Ursodeoxycholic acid（UDCA）exerts anti-atherogenic effects by inhibiting RAGE signaling in diabetic atherosclerosis [J]. PLoS One，2016，11（1）：e0147839.

[23] Wang YQ，Li LL，Zhao WB，et al. Targeted therapy of atherosclerosis by a broad-spectrum reactive oxygen species scavenging nanoparticle with intrinsic anti-inflammatory activity [J]. ACS Nano，2018，12（9）：8943-8960.

[24] Kim H，Han J，Park JH. Cyclodextrin polymer improves atherosclerosis therapy and reduces ototoxicity [J]. J Control Release，2020，319：77-86.

[25] Duchene D，Bochot A. Thirty years with cyclodextrins [J]. Int J Pharm，2016，514（1）：58-72.

[26] Kurkov SV，Loftsson T. Cyclodextrins [J]. Int J Pharm，2013，453（1）：167-180.

[27] Kim H，Kumar S，Kang DW，et al. Affinity-driven design of cargo-switching nanoparticles to leverage a cholesterol-rich microenvironment for atherosclerosis therapy [J]. ACS Nano，2020，14（6）：6519-6531.

[28] Zhang Y，Gong FL，Wu Y，et al. Poly-β-cyclodextrin supramolecular nanoassembly with a pH sensitive switch removing lysosomal cholesterol crystals for antiatherosclerosis [J]. Nano Lett，2021，21：9736-9745.

[29] Ma XL，Zhang TT，Luo ZG，et al. Functional nano-vector boost anti-atherosclerosis efficacy of berberine in Apoe（－/－）mice [J]. Acta Pharm Sin B，2020，10（9）：1769-1783.

[30] Teng C，Lin CS，Huang FF，et al. Intracellular codelivery of anti-inflammatory drug and anti-miR 155 to treat inflammatory disease [J]. Acta Pharm Sin B，2020，10（8）：1521-1533.
[31] Li XS，Zhu RG，Jiang H，et al. Curcumin ameliorates inflammation in atherogenesis by enhancing autophagy via the TFEB-p300-BRD4 axis [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B，2021，12（5）：2280-2299.
[32] Groen AK. Unexpected cholesterol gallstones [J]. Hepatology，2016，64（3）：711-713.
[33] Di CA，Wang DQ，Portincasa P. An update on the pathogenesis of cholesterol gallstone disease [J]. Curr Opin Gastroenterol，2018，34（2）：71-80.
[34] Sharma RK，Sonkar K，Sinha N，et al. Gallstones：a worldwide multifaceted disease and its correlations with gallbladder carcinoma [J]. PLoS One，2016，11（11）：e0166351.
[35] Stolk MF，Renooij W. Gallbladder emptying in vivo，bile composition，and nucleation of cholesterol crystals in patients with cholesterol gallstones [J]. Gastroenterology，1995，108：1882-1888.
[36] Nakagawa S. Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid [J]. Lancet，1977，310（8034）：367-369.
[37] Holzbach RT，Busch N. Nucleation and growth of cholesterol crystals [J]. Gastroenterol Clin N，1991，20（1）：67-84.
[38] Raghavendra CK，Srinivasan K. Influence of dietary tender cluster beans（*Cyamopsis tetragonoloba*）on biliary proteins，bile acid synthesis and cholesterol crystal growth in rat bile [J]. Steroids，2015，94：21-30.
[39] Vidyashankar S，Sambaiah K，Srinivasan K. Effect of dietary garlic and onion on biliary proteins and lipid peroxidation which influence cholesterol nucleation in bile [J]. Steroids，2010，75（3）：272-281.
[40] Bucan K，Lukic M，Bosnar D，et al. Analysis of association of risk factors for age-related macular degeneration [J]. Eur J Ophthalmol，2022，32（1）：410-416.
[41] Kananen F，Strandberg T，Loukovaara S，et al. Early middle age cholesterol levels and the association with age-related macular degeneration [J]. Acta Ophthalmol，2021，99（7）：e1063-e1069.
[42] Blasiak J. Senescence in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. Cell Mol Life Sci，2020，77（5）：789-805.
[43] 武明星，郑政，周希瑗 . 年龄相关性黄斑变性流行病学研究进展 [J]. 国际眼科杂志，2015，15（2）：223-227.
[44] Christakopoulos C，Pryds A，Larsen M. Subretinal lamellar bodies in polypoidal choroidal vasculopathy [J]. Acta Ophthalmol，2013，91（3）：e248-e249.
[45] Pang CE，Messinger JD，Zanzottera，EC，et al. The onion sign in neovascular age-related macular degeneration represents cholesterol crystals [J]. Ophthalmology，2015，122（11）：2316-2326.
[46] 张敬法，张宇萌，孙晓东 . 干性年龄相关性黄斑变性发病机制及治疗 [J]. 眼科新进展，2022，42（3）：169-178.
[47] 爽耿 . 含膳食抗氧化剂的食品与老年性黄斑变性的防治 [J]. 中国食品学报，2003，3（1）：102-106.
[48] Vavvas DG，Daniels AB，Kapsala ZG，et al. Regression of some high-risk features of age-related macular degeneration（AMD）in patients receiving intensive statin treatment [J]. EbioMedicine，2016，5：198-203.
[49] Zhang T，Gillies M，Wang Y，et al. Simvastatin protects photoreceptors from oxidative stress induced by all-trans-retinal，through the up-regulation of interphotoreceptor retinoid binding protein [J]. Br J Pharmacol，2019，176（12）：2063-2078.
[50] Rozing MP，Durhuus JA，Krogh NM，et al. Age-related macular degeneration：a two-level model hypothesis [J]. Prog Retin Eye Res，2020，76：100825.
[51] Roizenblatt M，Naranjit N，Maia M，et al. The question of a role for statins in age-related macular degeneration [J]. Int J Mol Sci，2018，19（11）：3688.
[52] Tian B，Al-Moujahed A，Bouzika P，et al. Atorvastatin promotes phagocytosis and attenuates pro-inflammatory response in human retinal pigment epithelial cells [J]. Sci Rep，2017，7（1）：2329.
[53] Biswas L，Zhou X，Dhillon B，et al. Retinal pigment epithelium cholesterol efflux mediated by the 18 kDa translocator protein，TSPO，a potential target for treating age-related macular degeneration [J]. Hum Mol Genet，2017，26（22）：4327-4339.
[54] Biswas L，Ibrahim KS，Li X，et al. Effect of a TSPO ligand on retinal pigment epithelial cholesterol homeostasis in high-fat fed mice，implication for age-related macular degeneration [J]. Exp Eye Res，2021，208：108625.
[55] 刘聪燕，瞿鼎，陈彦 . 中药活性成分防治年龄相关性黄斑变性的研究进展 [J]. 药学学报，2022，57（5）：1219-1234.
[56] Biswas L，Zeng Z，Graham A，et al. Gypenosides mediate cholesterol efflux and suppress oxidized LDL induced inflammation in retinal pigment epithelium cells [J]. Exp Eye Res，2020，191：107931.
[57] Rosenbaum AI，Zhang G，Warren JD，et al. Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells [J]. Proc Natl Acad Sci，2010，107（12）：5477-5482.
[58] Silva T，Teixeira J，Remiao F，et al. Alzheimer’s disease，cholesterol，and statins：the junctions of important metabolic pathways [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2013，52（4）：1110-1121.
[59] Habchi J，Chia S，Galvagnion C，et al. Cholesterol catalyses Abeta42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes [J]. Nat Chem，2018，10（6）：673-683.
[60] Wang H，Kulas JA，Wang C，et al. Regulation of beta-amyloid production in neurons by astrocyte-derived cholesterol [J]. Proc Natl Acad Sci，2021，118（33）：e2102191118.
[61] 许凤丽，徐基祥，熊霞，等 . 皮下胆固醇结晶 1 例 [J]. 中国皮肤性病杂志，2019，33（9）：1060.

（收稿日期：2022-10-31；修回日期：2022-12-15）

纳米载药技术在几种常见自身免疫性疾病模型中的应用研究进展

罗仁幸[1, 2]，王妍妍[1]，黄功华[1*]（广东医科大学，1. 广东省医学分子诊断重点实验室；2. 医学技术学院，广东 东莞 523808）

摘要：自身免疫性疾病（AD）是由于自身抗原免疫耐受紊乱导致机体损害的一类疾病。大多数患者在临床诊断期间常出现组织破坏和并发症，严重影响患者生活质量。目前，对 AD 的治疗主要包括广谱抗炎药物或非特异性的免疫抑制药物。然而，长期和广泛使用免疫抑制剂和细胞毒性药物会降低身体的正常免疫反应，并增加罹患癌症和感染的潜在风险。作为一项有巨大潜力的生物医学领域新技术，纳米载药技术具有可控、稳定和靶向性的特点，近年来被广泛应用于 AD 等疾病的治疗中。本文综述了纳米载药技术在几种常见 AD 中的最新应用研究，旨在为后续基于纳米载药技术的治疗方法提供新的思路，并支持临床应用转化。

关键词：纳米载药；自身免疫性疾病；抗风湿药物
中图分类号：R97，R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1890-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.032

Research progress in nano-drug loading technology in autoimmune disease models

LUO Ren-xing[1, 2], WANG Yan-yan[1], HUANG Gong-hua[1*] (1. *Guangdong Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics*; 2. *School of Medical Technology*, *Guangdong Medical University*, *Dongguan Guangdong* 523808)

Abstract: Autoimmune diseases (AD) are caused by disorder of immune tolerance to autoantigens. Tissue destruction and complications often occur in most patients during clinical diagnosis, which seriously affects the quality of life of patients. So far, the treatment for AD mainly includes broad-spectrum anti-inflammation drugs or non-specific immunosuppressants. However, long-term and widespread use of immunosuppressants and cytotoxic drugs reduces the body's normal immune responses and increases the potential risk of cancer and infection. As a new technology with great potential in biomedicine, nano-drug loading technology has the characteristics of controllability, stability and targeting, and has been widely used in the treatment of AD and other diseases in recent years. In this review, we summarized the latest application of nano-drug loading technology in common autoimmune diseases, to provide new strategies for the treatment based on nano-drug loading technology and support clinical application transformation.

Key words: nano-drug loading; autoimmune disease; antirheumatic drug

纳米技术以纳米科学为基础，研究纳米尺寸范围内材料的性质及其应用。在过去二十几年间，生物医学领域见证了纳米载体封装化合物研发及其用于治疗各种疾病，以及检测特定物质或标志物研究的爆炸性增长。目前，国内外批准应用或已经进入临床试验的纳米药物递送系统（简称

基金项目：广东省基础与应用基础研究基金项目（No.2021B1515130004，No.2021B1515140021）。
作者简介：罗仁幸，男，在读硕士研究生，主要从事纳米载药技术在免疫学应用方面的研究，email：Luorenxing2020@163.com
[*]**通信作者：**黄功华，男，博士，研究员，博士研究生导师，主要从事树突状细胞与免疫微环境中其他细胞复杂的免疫调控网络及其在疾病中的作用机制研究，email：gonghua.huang@gdmu.edu.cn

“纳米药物”）已经有数十种。我国已经投入应用于肿瘤治疗领域的纳米药物有戈舍瑞林缓释植入剂[1]、阿霉素脂质体[2]、白蛋白结合型紫杉醇[3-5]、紫杉醇脂质体[6-7]等。同时，广泛的研究评估了由具有不同形状、大小、表面化学和结构的各种材料产生的纳米颗粒的效能[8]。许多活性药物成分，包括化疗药物[9]、细胞因子[10]、核苷酸[9]、肽[11]和免疫抑制剂[12]等，已经被单独或组合性地封装或修饰在这些化合物上，并通过不同的给药途径递送到相应的疾病动物模型中，用于研究该药物对相关疾病的治疗效果。

自身免疫性疾病（autoimmune diseases，AD）是由于自身抗原免疫耐受紊乱导致机体损害的一类疾病[13]。AD 包括器官特异性 AD 和系统性 AD。器官特异性 AD 是指患者的病变一般局限于某一特定的器官，由针对特定器官的自身免疫反应引起，例如银屑病（psoriasis）、多发性硬化（multiple sclerosis，MS）等。系统性 AD 是指免疫反应造成全身多器官和组织的病理损伤，例如系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）、类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）等。AD 发现并诊断较晚，同时病情缓解后容易复发，大多数患者在临床诊断期间常出现组织破坏的问题和并发症。目前，对 AD 的治疗主要包括广谱抗炎药物或非特异性的免疫抑制药物（如环孢素、他克莫司或皮质类固醇）等。这些药物主要是减少炎性细胞的增殖和抑制体内的免疫反应，可以缓解临床症状，但不能从根本上治愈疾病及消除并发症[14]。此外，长期和广泛使用免疫抑制剂和细胞毒性药物会降低机体的正常免疫反应，并增加罹患癌症和感染的潜在风险[15-17]。近十几年来，研究人员一直努力开发在不损害正常免疫功能的情况下，特异性抑制免疫反应的疗法，最终目标是恢复免疫稳态[18]。作为一项有巨大潜力的生物医学领域新技术，纳米载药技术具有可控、稳定和靶向性的特点，被广泛应用于 AD 等疾病的治疗。本文综述了纳米载药技术在 SLE、RA、银屑病和 MS 这几种常见 AD 中的最新应用进展，旨在为后续基于纳米载药技术的治疗提供新的思路。

1 纳米载药技术在几种常见 AD 治疗中的最新应用

1.1 SLE

SLE 是一种慢性自身免疫性炎症性疾病，其特征在于中枢和外周耐受性丧失、自身抗体的出现、免疫复合物的积累以及浸润白细胞对重要组织的广泛损害[19-21]。SLE 几乎在所有器官中都表现出一定的症状，从皮肤红斑到危及生命的肾小球肾炎[21]，该病无法治愈，对患者来说是一种严重的疾病负担。SLE 的标准治疗依赖于非甾体抗炎药物、皮质类固醇、抗疟药物和细胞抑制剂联合使用的长期治疗[22]。在过去五十年中，SLE 的病死率显著下降[23]，归因于使用免疫抑制剂以及更好的支持治疗和早期诊断。然而，难治性 SLE 的存在和持续使用免疫抑制剂的众多不良反应[24-25]迫使我们研究新的替代疗法。近年来，基于纳米技术而开发出的治疗或检测体系受到广泛的关注。

基于纳米颗粒的递送系统，可以选择性地将药物递送到发炎的组织或特定细胞，能够改善药物的疗效并且减轻不良反应。免疫抑制剂如环孢素 A 常用于治疗各种免疫性疾病，包括 SLE，但无反应率高和不良反应多，而免疫抑制剂的靶向递送可以帮助克服这些问题。Ravi Kumar 团队开发了一种可以生物降解的配体共轭纳米颗粒靶向 CD71 分子（转铁蛋白受体 1）的药物递送系统[26]。CD71 存在于肠上皮、绒毛间隐窝和派氏集合淋巴结[27]，T 细胞表达 CD71 是其成熟所必需的[28]。研究者假设递送环孢素 A 定向 CD71 到淋巴系统将改善 SLE 小鼠的肾小球肾炎，并设计了一系列的实验，评估了该递送系统的可靠性。结果与游离环孢素 A 相比，该递送系统增强了淋巴细胞的靶向性，说明其具有转化为 SLE 有效治疗方法的潜力。显然，该纳米递送系统运用纳米颗粒的缓释作用达到了环孢素 A 低剂量高效能的目的，但是 CD71 作为该系统的定向靶点需要考虑其在实际淋巴细胞表面的表达水平，否则该方法在临床转化应用中将面临更多的考验，例如脱靶效应。

在 SLE 的发病机制中，免疫细胞间的相互作用和调节性 T 细胞稳态丧失起到至关重要的作用[29-30]。因此，限制辅助性 T 细胞（helper T cells，Th）与 B 细胞的过度协作以消除自身抗体的产生，同时恢复调节性 T 细胞对效应性 $CD4^+$ T 细胞的控制，是一种有效治疗 SLE 的策略。段友容团队设计研究了负载雷帕霉素的 ICOS/CD40L 双特异性纳米颗粒，以实现疾病特异性方式的多靶点治疗[12]。利用来自 SLE 小鼠或患者的 Th 和 B 细胞的离体共培养分析以及体内 SLE 小鼠模型，研究者证实了负载雷帕霉素的 ICOS/CD40L 双特异性纳米颗粒选择性地靶向 SLE Th 细胞，并通过靶向共刺激双信号通路有效地抑制了 Th-B 细胞的相互激活，显著缓解了两种 SLE 小鼠模型（诱导性 SLE 小鼠模型和自发性 SLE 小鼠模型）的疾病进程。相较于其他纳米颗粒，该

研究以疾病特异性方式对 SLE 进行多靶点治疗。同时，该纳米颗粒具有长循环能力，优先靶向 SLE Th 细胞，并且在抑制 Th 细胞与 B 细胞相互作用方面及递送雷帕霉素中有协同作用，以最小的脱靶毒性恢复调节性 T 细胞的稳态 [12]。这种双特异性抗体的独特功能性纳米颗粒为 SLE 的治疗提供了一种新的联合治疗策略。

1.2 RA

RA 是一种与慢性炎症过程相关的系统性自身免疫性病变，可损害关节和关节外器官，包括心脏、肾脏、肺、消化系统、眼睛、皮肤和神经系统 [31]。RA 的病理特征在关节中主要有滑膜细胞增生、间质大量炎症细胞浸润、自身抗体产生以及软骨和骨组织破坏 [32]。虽然研究者们已经提出了许多生物分子机制，但 RA 的病因尚未完全阐明。目前一种较为主流的假说是瓜氨酸化异常导致抗瓜氨酸化蛋白抗体的产生 [33-34]。尽管近年来在治疗 RA 方面的理解和经验方面取得了重大进展，但是对 RA 的有效治疗仍然是一个挑战。同时，对控制抗体产生的分子机制缺乏了解，常导致治愈疾病非常困难。目前，缓解 RA 症状和减少疾病进展的主要方法仍然是药物治疗，例如有助于维持关节功能的抗风湿药物（disease-modifying antirheumatic drug，DMARD）。如果 RA 患者的症状控制不理想，则需要使用非甾体抗炎药物和糖皮质激素作为减少炎症的辅助治疗。据报道，长期使用抗风湿药物、非甾体抗炎药物和糖皮质激素对胃肠道、肝脏、心脏和肾功能均有不良影响 [35-37]。因此，在治疗 RA 的同时，克服这些治疗药物的局限性非常必要。而纳米技术赋予这些药物更高的生物相容性和更好的靶向性等。

地塞米松（dexamethasone，DEX）是治疗 RA 炎症的常用药物。然而，DEX 给药受到效率低和不良反应的明显限制。为了有效地将 DEX 输送到 RA 发炎的关节并克服现有的缺陷，Zhao 等 [38] 制备了葡聚糖硫酸盐（dextran sulfate，DS）修饰的负载 DEX 柔性脂质体水凝胶（DS-FLs/DEX 水凝胶）。对于佐剂诱导性关节炎的大鼠 RA 模型，DS-FLs/DEX 水凝胶可以有效地渗透和积聚在发炎的关节中，显著改善 RA 大鼠的关节肿胀，并减少 RA 对骨骼的破坏作用。同样的，甲氨蝶呤（methotrexate，MTX）也是用于治疗 RA 的主要药物，但严重毒性限制了其大量使用。Mirchandani 等 [39] 使用固体脂质纳米颗粒（solid lipid nanoparticles，SLN）作为 MTX 的载体，同时用透明质酸（hyaluronic acid，HA）修饰载药 SLN（HA-MTX-SLN），并在完全弗氏佐剂诱导的关节炎大鼠模型中评估其疗效，结果发现，MTX-SLN 和 HA-MTX-SLN 毒性均显著降低，并增强了口服给药时药物的活性。HA 涂层进一步丰富了 MTX 的抗风湿活性，因为它能够提高制剂的口服生物利用度和靶向药物递送。因此，纳米载药技术被认为是对化学药物减毒增效的有效方式，并且设计的靶向递送平台在临床上具有增强 RA 治疗的巨大潜力。

此外，炎性细胞浸润，特别是分泌各种炎性细胞因子的 M1 巨噬细胞，在 RA 的发病中起着至关重要的作用。有研究发现基于 M1-M2 巨噬细胞再极化的思路，将编码抗炎细胞因子 IL-10 的质粒 DNA（IL-10 pDNA）和化疗药物倍他米松磷酸钠（betamethasone sodium phosphate，BSP）封装到衍生自 M2 型巨噬细胞的仿生载体 M2 外泌体（M2 exosome，M2 Exo）中，能够有效缓解 RA 的关节炎症状 [40]。而 M2 Exo/pDNA/BSP 共递送系统的体外效率归因于 IL-10 pDNA 和 BSP 的协同作用，通过减少促炎细胞因子（IL-1β、TNF-α 等）的分泌和增加 IL-10 的表达来促进 M1-M2 巨噬细胞的再极化。Yang 等 [41] 开发了叶酸（folic acid，FA）修饰的银纳米颗粒（FA-Ag-NPs），可以主动递送到 M1 巨噬细胞中，协同诱导 M1 巨噬细胞还原和 M2 巨噬细胞极化，从而实现对 RA 的有效治疗。该团队设计的纳米颗粒在未负载任何药物的情况下，使用生物活性纳米颗粒促进 M1 巨噬细胞凋亡，同时诱导 M1 型向 M2 型巨噬细胞再极化进行靶向 RA 治疗。显然，减少 M1 型巨噬细胞或将其转化为抗炎型 M2 表型，是缓解滑膜炎症的一种有效策略。

1.3 银屑病

银屑病是一种由多种遗传和环境因素引起的皮肤自身免疫性疾病，如创伤、药物、感染、酒精、吸烟和压力，但其确切病因仍不清楚 [42]。其主要特征是角质形成细胞的过度增殖和异常分化以及真皮和表皮中免疫细胞的过度浸润 [43]，而且以红斑、鳞屑为主的临床症状严重影响患者情绪及生活质量。目前，银屑病的治疗主要包括局部药物和全身药物，具体药物的选择取决于疾病的不同阶段。局部药物主要是含有糖皮质激素或维生素 D_3 类似物的软膏，但是只对轻度银屑病有一定的疗效，而且还可能导致皮肤刺激的问题 [44]。重度银屑病通常需要使用全身治疗的免疫抑制剂或生物制剂，但是这些药物都存在肝脏和肾脏的不良反应，且可能引起免疫抑制 [45]。显然，鉴于现有的这些治疗方案的各种缺点与药物的毒性，长期使用会导致患者依从性差 [46]。因

此，迫切需要改进现有的治疗方法。

有研究认为在银屑病局部治疗中使用纳米技术以改进传统治疗的缺陷是公认的有效可行的策略[47]。研究发现，口服维生素 D_3 并不能改善银屑病患者的皮肤状况，而且由于维生素 D_3 高钙作用，还会出现明显的毒性反应[48]。这可能是由于该分子的血浆蛋白结合率非常高，并且只有少量的药物被递送到所需的作用部位。同时，在角质形成细胞和成纤维细胞上发现维生素 D_3 受体后，药物递送的重点从口服转向局部。Pukale 等[49]将维生素 D_3 封装到由脂质（液体和固体）和聚合物组成的多组分系统中，在咪喹莫特诱导的银屑病小鼠模型中，负载维生素 D_3 的脂质聚合物杂化纳米颗粒凝胶作为脂质聚合物混合纳米系统递送时，药物的功效有所提高。此外，针对银屑病因为单药治疗反应不佳的情况，Wang 等[50]制备了壳聚糖 / 透明质酸纳米凝胶（nanogel，NG），以共载 MTX 和 5- 氨基乙酰丙酸（5-aminolevulinic acid，ALA），即 MTX-ALA NG，促进 MTX 和 ALA 在皮肤中的渗透，用于银屑病的联合化学和光动力疗法，结果表明，MTX-ALA NG 可有效地改善咪喹莫特诱导的银屑病小鼠的皮肤症状，并下调促炎性细胞因子 TNF-α 和 IL-17α 的表达。同时，激光诱导光动力治疗后，细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）增加，以杀死过度增殖的细胞。同时，MTX-ALA NG 降低了口服 MTX 对肝脏和肾脏的毒性。据报道，MTX 与金纳米颗粒（MTX-gold nanoparticles，MTX-GNPs）的偶合有助于药物在离体系统中有效穿透人体皮肤屏障[51]。最近，在小鼠模型中，MTX-GNPs 的局部给药也可以减轻银屑病皮肤炎症，同时减少角质形成细胞过度增殖和 $CD8^+$ T 细胞数量[52]。而另外一项研究表明，MTX-GNPs 可以抑制细胞增殖、细胞因子产生和组织纤维化，并且能够促使皮肤免疫稳态的恢复[53]。Chung Hang Jonathan Choi 团队也设计了一种自我治疗型 GNPs，可用于对表皮角质形成细胞进行局部递送以预防和治疗银屑病，当其应用于咪喹莫特诱导的银屑病小鼠模型时，该 GNPs 治疗的效果与标准的类固醇和维生素 D_3 类似物一样有效，且不会造成脱毛和皮肤皱纹[54]。此外，该 GNPs 也不会在主要器官中积聚或引起长期毒性，为银屑病治疗提供了一种简单、安全和有效的替代方案。

1.4 MS

MS 是一种自身免疫性疾病，这种疾病的标志性病变通常出现在中枢神经系统中，包括脱髓鞘、胶质细胞增多、轴突病变和丢失以及神经变性等[55]。MS 的病因尚不清楚，但有研究结果表明，免疫系统在 MS 发病中起着重要作用，基因和环境因素也影响疾病的发展[56]。MS 通常以炎症开始，这是自身反应性 T 细胞（主要是 Th1）过度激活的结果，并且还出现了自我耐受性紊乱[57]。同时，炎症引起细胞膜连接分子的破坏，导致血脑屏障的紧密连接和完整性破坏，而通透性增加引起白细胞进入中枢神经系统[58]。B 细胞也被认为在 MS 的发病过程中发挥重要作用。B 细胞是外周免疫系统和中枢神经系统中重要的抗原提呈细胞，其可以通过特定的 B 细胞受体捕获可溶性蛋白，加工并将肽抗原与主要组织相容性复合体Ⅱ类分子结合并递呈给自身反应性 T 细胞[59]。目前，已经开发了几种治疗 MS 的药物，但是大都是非选择性地影响多数免疫细胞，并且安全性有待进一步探究[59]。因此，迫切需要开发没有严重不良反应，且具有高度特异性的 MS 治疗药物。

实验性自身免疫性脑脊髓炎（experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE）是人类炎症性脱髓鞘疾病 MS 最常用的实验模型[60]，该模型主要是在小鼠 / 大鼠皮下注射 35-55 表位的髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白（myelin oligodendrocyte glycoprotein，MOG_{35-55}）[55]。许多研究结果表明，将 MOG_{35-55} 肽偶联到聚合物纳米颗粒中，在 EAE 的小鼠模型中能够诱导免疫耐受而减轻临床症状[61-63]。此外，Theodore Tselios 的研究也得到同样的结果。该研究团队开发了一种负载有基于小鼠 / 大鼠 MOG_{35-55} 与糖残基偶联的肽的聚合物纳米颗粒，可有效降低 EAE 临床评分和中枢神经系统炎症[64]。注射该偶联了 MOG_{35-55} 的聚合物纳米颗粒到动物体内类似于疫苗接种，通过聚合物纳米颗粒稳定释放自身抗原以诱导免疫耐受。

显然，纳米技术在中枢神经系统药物递送中发挥着关键而独特的作用。研究发现，在降低 EAE 模型的临床评分中，封装至 SLN 中的富马酸二甲酯（dimethyl fumarate，DMF）与游离 DMF 一样有效，但在皮下给药时减少了给药次数[65]。此外，与游离 DMF（口服）的预防性治疗相比，SLN-DMF 预防性治疗部分阻止了血液中 T 细胞与 B 细胞比例的降低，表明 SLN-DMF 不改变淋巴细胞群比例。最近，Mehdi-Alamdarlou 等[66]设计了一种精确的 DMF 药物递送系统，以跨越血脑屏障。该递送系统是一种基于血小板的仿生载体，用于将 DMF 递送到外周和中枢神经系统的发炎区域。并且体内研究结果表明，血小板纳米颗粒在大脑中的浓度均高于游离药物溶液。因此，

最近不断有研究将细胞作为转运媒介，将纳米载体靶向递送到相关病变部位。Carnasciali 等 [67] 开发了一种基于纳米技术的细胞介导给药系统，该系统通过将与抗 CD20 单克隆抗体结合的纳米颗粒加载到髓鞘抗原特异性 T 细胞中。在 EAE 中测试该系统，结果显示脊髓 B 细胞的耗尽改善了疾病过程并减轻了组织病变。而另一项研究也同样通过细胞将纳米颗粒递送到大脑中。该团队将白血病抑制因子加载至纳米颗粒上，然后将纳米颗粒附着在 $CD4^+$ T 细胞上作为药物跨过血脑屏障，并且研究结果表明该方法是安全有效的 [68]。

1.5 几种常见 AD 动物模型中的纳米靶向应用

大量研究阐明了纳米粒子到达靶标的过程，这些研究为新一代靶向技术提供了基础知识 [69]。例如，可以利用血清对载脂蛋白的吸附实现肝脏靶向 [70]、利用白蛋白的内源性运输过程提高淋巴结蓄积 [71]、以肽修饰纳米颗粒后采用类似病毒主动运输途径深层穿透肿瘤组织 [72]。纳米载药技术正朝着提高药物靶向性发展，其在几种常见的 AD 动物模型中的应用，大多数也是在纳米粒的表面修饰了具有靶向性的分子，使得纳米药物可以靶向病变部位。表 1 汇总了上述纳米药物的靶向方式、靶向性分子、作用靶点、治疗疾病和发挥的作用。

表 1 几种常见的自身免疫性疾病动物模型中的纳米靶向应用

Tab 1 Application of nano-targeting in several common animal models of autoimmune diseases

靶向方式	靶向性分子	作用靶点	治疗疾病	发挥的作用	文献
被动靶向	纳米颗粒凝胶	局部病变	银屑病	增强皮肤的渗透和保留	[49-50]
主动靶向	藤黄酸	转铁蛋白受体	SLE	靶向淋巴组织	[26]
	抗 ICOS 抗体，抗 CD40L 抗体	ICOS，CD40L	SLE	阻断 Th 细胞和 B 细胞相互作用	[12]
	葡聚糖硫酸盐	A 类清道夫受体	RA	靶向高表达 A 类清道夫受体的巨噬细胞	[38]
	HA	CD44	RA	提高了生物利用度和靶向给药	[39]
	FA	M1 巨噬细胞	RA	实现 M1 巨噬细胞靶向递送	[41]
	M2 外泌体	炎症部位	RA	炎症嗜性和内在抗炎功能	[40]
	血小板	炎症部位	MS	延长药物的循环时间，减少其分布，并防止其被免疫细胞清除	[66]
	T 细胞	炎症部位	MS	没有明显的细胞毒性，靶向炎症部位，减轻了临床症状	[67-68]

2 结语

目前还没有一种治疗方法能够安全有效地治愈 AD，其治疗通常以抑制为导向，而不是根本性治愈。同时，AD 治疗新药物的开发仍然面临许多挑战，所以治疗这些疾病需要使用药物组合的治疗方案或尝试结合新型纳米载体。各种新型纳米颗粒药物载体已成功用于 MTX、糖皮质激素、单克隆抗体等各种药物的安全有效递送。此外，纳米载体具有以最小的毒性而提高治疗效果的特点，这减少了药物总剂量的消耗，并且能够靶向理想部位而减少全身性不良反应。然而，大多数研究药物还仅限于 AD 模型的动物实验，几乎没有关于纳米颗粒在临床上的治疗研究。因此，目前的研究仍有巨大发展潜力，并且需要进行更加深入的研究以获得更多的数据，为进一步临床实践转化提供支持。

参考文献

[1] 罗红元 . 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂结合腹腔镜手术治疗子宫内膜异位症的疗效观察 [J]. 现代医学与健康研究，2022，6（13）：61-63.

[2] 高碧丽，丁玉兰，黎慧娟，等 . 两种方法预防阿霉素脂质体化疗所致静脉炎的比较 [J]. 中国卫生标准管理，2018，9（18）：165-167.

[3] 王崇，陆林，高世乐 . 白蛋白结合型紫杉醇联合卡铂在铂类敏感复发性卵巢癌患者中的临床观察 [J]. 医学研究杂志，2019，48（11）：153-157.

[4] 李文文，韩磊，张志国，等 . 白蛋白结合型紫杉醇治疗晚期难治性恶性肿瘤的疗效及安全性 [J]. 中国医师杂志，2019，21（12）：1803-1807.

[5] 李雨，黎苏，孙博，等 . 某院白蛋白结合型紫杉醇应用分析与合理性评价 [J]. 中南药学，2021，19（1）：143-148.

[6] 钱生勇，冯平，徐艳艳 . 某院 24 例紫杉醇脂质体不良反应分析 [J]. 中南药学，2012，10（10）：796-797.

[7] 刘义冰，董倩，杨瑞合，等 . 免预处理使用注射用紫杉醇脂体（力扑素）不良反应的临床观察 [J]. 当代医学，2009，15（36）：99.

[8] Sun QX，Ojha T，Kiessling F，et al. Enhancing tumor penetration of nanomedicines [J]. Biomacromolecules，2017，18（5）：1449-1459.

[9] Gu FF，Hu CL，Cao W，et al. Tumor microenvironment multiple responsive nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin and CpG against triple-negative breast cancer [J]. Int J Nanomedicine，2022，17：4401-4417.

[10] Wang H，Liu HW，Li J，et al. Cytokine nanosponges suppressing overactive macrophages and dampening systematic cytokine storm for the treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Bioact Mater，2023，21：531-546.

[11] Hrapovic S，Martinez-Farina CF，Sui J，et al. Design of chitosan nanocrystals decorated with amino acids and peptides [J]. Carbohydr Polym，2022，298：120108.
[12] Zhang JL，Guo QQ，Dai D，et al. Rapamycin-encapsulated costimulatory ICOS/CD40L-bispecific nanoparticles restrict pathogenic helper T-B-cell interactions while in situ suppressing mTOR for lupus treatment [J]. Biomaterials，2022，289：121766.
[13] Pulendran B，Davis MM. The science and medicine of human immunology [J]. Science，2020，369（6511）：eaay4014.
[14] Li H，Yang YG，Sun TM. Nanoparticle-based drug delivery systems for induction of tolerance and treatment of autoimmune diseases [J]. Front Bioeng Biotechnol，2022，10：889291.
[15] Michot JM，Bigenwald C，Champiat S，et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade：a comprehensive review [J]. Eur J Cancer，2016，54：139-148.
[16] Shakartalla SB，Alhumaidi RB，Shammout ODA，et al. Dyslipidemia in breast cancer patients increases the risk of SARCoV-2 infection [J]. Infect Genet Evol，2021，92：104883.
[17] Anuta V，Talianu MT，Dinu-Pirvu CE，et al. Molecular mapping of antifungal mechanisms accessing biomaterials and new agents to target oral candidiasis [J]. Int J Mol Sci，2022，23（14）：7520.
[18] Yang Y，Santamaria P. Evolution of nanomedicines for the treatment of autoimmune disease：from vehicles for drug delivery to inducers of bystander immunoregulation [J]. Adv Drug Deliv Rev，2021，176：113898.
[19] Tsokos GC，Lo MS，Costa RP，et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. Nat Rev Rheumatol，2016，12（12）：716-730.
[20] Moulton VR，Tsokos GC. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity [J]. J Clin Invest，2015，125（6）：2220-2227.
[21] Mohan C，Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis [J]. Nat Rev Nephrol，2015，11（6）：329-341.
[22] Xiong W，Lahita RG. Pragmatic approaches to therapy for systemic lupus erythematosus [J]. Nat Rev Rheumatol，2014，10（2）：97-107.
[23] Bernatsky S，Boivin JF，Joseph L，et al. Mortality in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum，2006，54（8）：2550-2557.
[24] Ruiz-Irastorza G，Danza A，Khamashta M. Glucocorticoid use and abuse in SLE [J]. Rheumatology（Oxford），2012，51（7）：1145-1153.
[25] Campar A，Farinha F，Vasconcelos C. Refractory disease in systemic lupus erythematosus [J]. Autoimmun Rev，2011，10（11）：685-692.
[26] Ganugula R，Arora M，Zou DX，et al. A highly potent lymphatic system-targeting nanoparticle cyclosporine prevents glomerulonephritis in mouse model of lupus [J]. Sci Adv，2020，6（24）：eabb3900.
[27] Banerjee D，Flanagan PR，Cluett J，et al. Transferrin receptors in the human gastrointestinal tract. Relationship to body iron stores [J]. Gastroenterology，1986，91（4）：861-869.
[28] Ned RM，Swat W，Andrews NC. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development [J]. Blood，2003，102（10）：3711-3718.
[29] Li H，Boulougoura A，Endo Y，et al. Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus：new insights in pathogenesis and therapeutic strategies [J]. J Autoimmun，2022，doi：10.1016/j.jaut.2022.102870.
[30] Szelinski F，Lino AC，Dorner T. B cells in systemic lupus erythematosus [J]. Curr Opin Rheumatol，2022，34（2）：125-132.
[31] Radu AF，Bungau SG. Management of rheumatoid arthritis：an overview [J]. Cells，2021，10（11）：2857.
[32] Mcinnes IB，Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med，2011，365（23）：2205-2219.
[33] Wegner N，Lundberg K，Kinloch A，et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis [J]. Immunol Rev，2010，233（1）：34-54.
[34] Kurowska W，Kuca-Warnawin EH，Radzikowska A，et al. The role of anti-citrullinated protein antibodies（ACPA）in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Cent Eur J Immunol，2017，42（4）：390-398.
[35] Oray M，Abu SK，Ebrahimiadib N，et al. Long-term side effects of glucocorticoids [J]. Expert Opin Drug Saf，2016，15（4）：457-465.
[36] Schett G，Emery P，Tanaka Y，et al. Tapering biologic and conventional DMARD therapy in rheumatoid arthritis：current evidence and future directions [J]. Ann Rheum Dis，2016，75（8）：1428-1437.
[37] Buttgereit F. Views on glucocorticoid therapy in rheumatology：the age of convergence [J]. Nat Rev Rheumatol，2020，16（4）：239-246.
[38] Zhao YP，Han JF，Zhang FY，et al. Flexible nano-liposomes-based transdermal hydrogel for targeted delivery of dexamethasone for rheumatoid arthritis therapy [J]. Drug Deliv，2022，29（1）：2269-2282.
[39] Mirchandani Y，Patravale VB，Brijesh S. Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles enhance antirheumatic activity and reduce toxicity of methotrexate [J]. Nanomedicine（Lond），2022，17（16）：1099-1114.
[40] Li H，Feng Y，Zheng X，et al. M2-type exosomes nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy via macrophage repolarization [J]. J Control Release，2022，341：16-30.
[41] Yang YH，Guo LN，Wang Z，et al. Targeted silver nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy via macrophage apoptosis and repolarization [J]. Biomaterials，2021，264：120390.
[42] Mabuchi T，Chang TW，Quinter S，et al. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis [J]. J Dermatol Sci，2012，65（1）：4-11.
[43] Yu JD，Zhao QX，Wang XY，et al. Pathogenesis，multi-omics research，and clinical treatment of psoriasis [J]. J Autoimmun，2022，133：102916.
[44] Yan YZ，Liang HY，Liu XL，et al. Topical cationic hairy particles targeting cell free DNA in dermis enhance treatment of psoriasis [J]. Biomaterials，2021，276：121027.

[45] Rendon A，Schakel K. Psoriasis pathogenesis and treatment [J]. Int J Mol Sci，2019，20（6）：1475.

[46] Chen AQ，Luo YT，Xu J，et al. Latest on biomaterial-based therapies for topical treatment of psoriasis [J]. J Mater Chem B，2022，10（37）：7397-7417.

[47] Fereig SA，El-Zaafarany GM，Arafa MG，et al. Tackling the various classes of nano-therapeutics employed in topical therapy of psoriasis [J]. Drug Deliv，2020，27（1）：662-680.

[48] Ingram MA，Jones MB，Stonehouse W，et al. Oral vitamin D_3 supplementation for chronic plaque psoriasis：a randomized，double-blind，placebo-controlled trial [J]. J Dermatolog Treat，2018，29（7）：648-657.

[49] Pukale SS，Mittal A，Chitkara D. Topical application of vitamin D3-loaded hybrid nanosystem to offset imiquimod-induced psoriasis [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2021，22（7）：238.

[50] Wang YX，Fu SJ，Lu Y，et al. Chitosan/hyaluronan nanogels co-delivering methotrexate and 5-aminolevulinic acid：a combined chemo-photodynamic therapy for psoriasis [J]. Carbohydr Polym，2022，277：118819.

[51] Bessar H，Venditti I，Benassi L，et al. Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2016，141：141-147.

[52] Fratoddi I，Benassi L，Botti E，et al. Effects of topical methotrexate loaded gold nanoparticle in cutaneous inflammatory mouse model [J]. Nanomedicine，2019，17：276-286.

[53] Ozcan A，Sahin D，Impellizzieri D，et al. Nanoparticle-coupled topical methotrexate can normalize immune responses and induce tissue remodeling in psoriasis [J]. J Invest Dermatol，2020，140（5）：1003-1014 e8.

[54] Han RF，Ho LWC，Bai QQ，et al. Alkyl-terminated gold nanoparticles as a self-therapeutic treatment for psoriasis [J]. Nano Lett，2021，21（20）：8723-8733.

[55] Rahiman N，Mohammadi M，Alavizadeh SH，et al. Recent advancements in nanoparticle-mediated approaches for restoration of multiple sclerosis [J]. J Control Release，2022，343：620-644.

[56] Rodriguez MS，Farez MF，Quintana FJ. The immune response in multiple sclerosis [J]. Annu Rev Pathol，2022，17：121-139.

[57] Hemmer B，Nessler S，Zhou D，et al. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis [J]. Nat Clin Pract Neurol，2006，2（4）：201-211.

[58] Lecuyer MA，Saint-Laurent O，Bourbonniere L，et al. Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2017，114（4）：E524-E533.

[59] Selter RC，Hemmer B. Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis [J]. Immunotargets Ther，2013，2：21-30.

[60] Constantinescu CS，Farooqi N，O'brien K，et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis（EAE）as a model for multiple sclerosis（MS）[J]. Br J Pharmacol，2011，164（4）：1079-1106.

[61] Keijzer C，Slutter B，Van DZR，et al. PLGA，PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity [J]. PLoS One，2011，6（11）：e26684.

[62] Gholamzad M，Ebtekar M，Shafiee Ardestani M. Intravenous injection of myelin oligodendrocyte glycoprotein-coated PLGA microparticles have tolerogenic effects in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol，2017，16（3）：271-281.

[63] Gholamzad M，Baharlooi H，Shafiee AM，et al. Prophylactic and therapeutic effects of MOG-conjugated PLGA nanoparticles in C57Bl/6 mouse model of multiple sclerosis [J]. Adv Pharm Bull，2021，11（3）：505-513.

[64] Triantafyllakou I，Clemente N，Khetavat RK，et al. Development of PLGA nanoparticles with a glycosylated myelin oligodendrocyte glycoprotein epitope（MOG35-55）against experimental autoimmune encephalomyelitis（EAE）[J]. Mol Pharm，2022，19（11）：3795-3805.

[65] Bevilacqua Rolfsen Ferreira Da Silva G，Pereira Das Neves S，Roque Oliveira SC，et al. Comparative effectiveness of preventive treatment with dimethyl fumarate-loaded solid lipid nanoparticles and oral dimethyl fumarate in a mouse model of multiple sclerosis [J]. J Autoimmun，2022，132：102893.

[66] Mehdi-Alamdarlou S，Ahmadi F，Azadi A，et al. A cell-mimicking platelet-based drug delivery system as a potential carrier of dimethyl fumarate for multiple sclerosis [J]. Int J Pharm，2022，625：122084.

[67] Carnasciali A，Amoriello R，Bonechi E，et al. T cell delivery of nanoparticles-bound anti-CD20 monoclonal antibody：successful B cell depletion in the spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neuroimmune Pharmacol，2021，16（2）：376-389.

[68] De La Flor R，Robertson J，Shevchenko RV，et al. Multiple sclerosis：LIFNano-CD4 for trojan horse delivery of the neuro-protective biologic "LIF" into the brain：preclinical proof of concept [J]. Front Med Technol，2021，3：640569.

[69] Bhatia SN，Chen XY，Dobrovolskaia MA，et al. Cancer nanomedicine [J]. Nat Rev Cancer，2022，22（10）：550-556.

[70] Wolfrum C，Shi SP，Jayaprakash KN，et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs [J]. Nat Biotechnol，2007，25（10）：1149-1157.

[71] Liu HP，Moynihan KD，Zheng YR，et al. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines [J]. Nature，2014，507（7493）：519-522.

[72] Sugahara KN，Teesalu T，Karmali PP，et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs [J]. Science，2010，328（5981）：1031-1035.

（收稿日期：2022-09-20；修回日期：2022-11-05）

NLRP3 炎症小体在肿瘤中的作用及其抑制剂研究进展

陈秀会[1]，郑裕彤[1]，叶卫军[1*]，孙平[2*]（1. 东莞市第八人民医院（东莞市儿童医院）药学部，广东　东莞　523000；2. 广州医科大学药学院，广州　511436）

摘要：NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NLRP3）炎症小体是固有免疫系统的重要组成部分，由 NLRP3、ASC 和 Pro-caspase-1 组装形成，能介导 IL-1β 和 IL-18 等炎性因子的成熟和释放，促进炎症反应，而肿瘤微环境中的慢性炎症对免疫抑制和肿瘤的发生发展具有重要的影响，先天免疫系统中异常活化的 NLRP3 炎症小体能促进多种肿瘤的发生和发展，因此 NLRP3 炎症小体成为了抗肿瘤药物研发比较热门的靶标，现对 NLRP3 炎症小体在一些特定类型的肿瘤中的作用进行介绍，并围绕近年来抑制 NLRP3 炎症小体的新药开发及药物与相关肿瘤的研究进展进行综述。

关键词：NLRP3 炎症小体；肿瘤；NLRP3 炎症小体抑制剂
中图分类号：R739.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1897-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.033

Role of NLRP3 inflammasome in tumors and its inhibitors

CHEN Xiu-hui[1], ZHENG Yu-tong[1], YE Wei-jun[1*], SUN Ping[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Eighth People's Hospital of Dongguan* (*Dongguan Children's Hospital*), *Dongguan*　*Guangdong*　523000; 2. *College of Pharmacy*, *Guangzhou Medical University*, *Guangzhou*　511436)

Abstract: NLRP3 inflammasome is an important part of the innate immune system, consisting of NLRP3, ASC and Pro-caspase-1, which can mediate the maturation and release of inflammatory factors such as IL-1β and IL-18, and promote the inflammatory response. Chronic inflammation accelerates the immunosuppression and tumorigenesis in the tumor microenvironment. The abnormally activated NLRP3 inflammasome can promote the development of multiple tumors, and therefore, NLRP3 inflammasome is a relatively popular target in the development of anti-tumor drugs. This paper introduced the role of NLRP3 inflammasome in some specific tumors, and reviewed the advance in drug research targets for NLRP3 inflammasome, and cancer therapy.

Key words: NLRP3 inflammasome; tumor; NLRP3 inflammasome inhibitor

恶性肿瘤是居心脑血管疾病后的引起人类死亡的第二病因，其发病率正逐年升高，呈现年轻化态势，成为危害人类身体健康最危险的因素之一，给患者家庭和社会带来了沉重的负担。慢性炎症在肿瘤诱发、促进、侵袭和转移等方面都具有决定性作用[1-4]。炎症反应能增强多种氧化酶的表达，促使大量活性氧（reactive oxygen species，ROS）和活性氮的产生并造成细胞 DNA 和线粒体损伤，进而抑制组织细胞损伤后的修复过程，并促进抑癌基因失活，此外，由炎症反应产生的细胞因子会抑制细胞凋亡、诱导血管新生、抑制免疫和炎症信号传导，从而促进肿瘤的发生和发展。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）炎症小体是固有免疫系统的重要组成部分，是炎症反应的核心，异常活化的 NLRP3 炎症小体能促进一些肿瘤的发生和发展。随着对 NLRP3 炎症小体和肿瘤相关研究的深入，

基金项目：广州市基础研究计划基础与应用基础研究项目（No.202102080450）。
作者简介：陈秀会，女，博士，主要从事抗炎免疫药理研究，email：2318493187@qq.com　*通信作者：孙平，男，副研究员，硕士研究生导师，主要从事炎症免疫性疾病发病机制及治疗研究，email：Sun_ping@gzhmu.edu.cn；叶卫军，男，副主任药师，主要从事临床药学相关研究，email：23805299@qq.com

目前 NLRP3 炎症小体已经成为抗肿瘤药物研发的重要潜在靶标。本文就 NLRP3 炎症小体信号通路在一些肿瘤中的作用进行综述，并围绕近年来针对 NLRP3 炎症小体的新药开发与肿瘤的研究进展进行介绍。

1 NLRP3 炎症小体信号通路

炎症小体是一类通过各种病原微生物感染或细胞压力刺激激活组装的高分子蛋白质复合物，其活化能引起白细胞介素（IL）-1β（IL-1β）与 IL-18 的快速释放，进而募集天然免疫细胞来防御入侵者对机体的侵害。研究发现炎症小体的功能调节障碍与肿瘤 [5-6]、自身免疫性疾病 [7-8]、神经退行性变性疾病 [9-10]、糖尿病 [11-12]、动脉粥样硬化 [12-13] 等疾病的发生发展密切相关。NLR 家族中五种受体蛋白（NLRP1、NLRP3、NLRC4、AIM2、pyrin）的寡聚化是形成炎症小体和激活半胱氨酸前体蛋白 Pro-caspase-1 的必要条件，Pro-caspase-1 被激活后形成成熟的 caspase-1，进而剪切 Pro-IL-1β 和 Pro-IL-18 为具有生物活性的 IL-1β 和 IL-18。由以上五种受体蛋白结合形成的炎症小体分别是 NLRP1 炎症小体、NLRP3 炎症小体、NLRC4 炎症小体、AIM2 炎症小体、pyrin 炎症小体。NLRP3 炎症小体是当前研究最为深入的一种，其由 NLRP3 支架、凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing CARD，ASC）和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1（cysteinyl aspartate specific proteinase，caspase-1）三部分组成，NLRP3 炎症小体主要在免疫细胞中表达，包括炎症刺激触发的巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞、中性粒细胞。当 NLRP3 炎症小体发生异常活化时会诱发炎性疾病 [14-15]。

NLRP3 炎症小体的活化包括经典活化信号通路和非经典活化信号通路，经典活化信号通路需要两步刺激（见图 1），第一步为预处理过程，是由多种外源微生物或内源性分子刺激细胞，诱导 NF-κB 信号通路的活化，进而调控 NLRP3 和 Pro-IL-1β 的转录表达，为第二步的激活过程做准备。激活过程是由特定的活化剂 [如尼日利亚菌素、三磷酸腺苷（ATP）等] 刺激细胞，通过多种分子效应促进 NLRP3 炎症小体组装，介导 IL-1β 和 IL-18 的剪切和成熟。对于 NLRP3 炎症小体的激活过程，目前比较公认的有以下几种机制：

① 钾离子外流：钾离子外流是众多活化剂诱导 NLRP3 炎症小体活化的共同步骤，ATP 与 P2X7R 的结合促进钾离子外流 [16]，进一步促进 NLRP3 炎性小体的组装与激活，但有研究否定了钾离子外流对于 NLRP3 炎症小体活化的必要性 [17]。② 钙离子流动：细胞质和内质网是细胞内主要的钙离子贮存库，钙离子流动可能与 NLRP3 炎症小体的激活密切相关，当阻断钙离子信号传导时会抑制 NLRP3 炎症小体的激活 [18]，抑制内质网上的细胞内钙释放通道——肌醇 1，4，5- 三磷酸受体降低钙离子的流动时，也会抑制 NLRP3 炎症小体的活化 [19]，然而，有研究发现，钙离子对于 NLRP3 炎症小体的激活也不是必要的 [18]，因此关于钙信号在 NLRP3 炎症小体激活中的作用仍待明确。③ 线粒体功能障碍：随着钙离子的胞内流入，线粒体内钙容量负荷，诱发线粒体功能障碍促进 ROS 和线粒体 DNA 释放到细胞质中，从而促进 NLRP3 炎症小体的激活，最新研究表明线粒体电子传递链是 NLRP3 炎症小体活化所必需的 [20]，氧化型低密度脂蛋白、胆固醇晶体、饱和脂肪酸和鞘脂等激动剂就是通过激活 NADPH 氧化酶和线粒体其他氧化系统促使 ROS 产生而激活 NLRP3 炎症小体。④ 溶酶体组织蛋白酶 B 的释放：吞噬细胞吞噬周围的微粒促进溶酶体内的组织蛋白酶 B 释放诱发 NLRP3 炎症小体活化 [21]，而在缺乏组织蛋白酶 B 的巨噬细胞中几乎无法检测到 NLRP3 炎症小体的激活 [22]，说明组织蛋白酶 B 对 NLRP3 炎症小体的活化具有调控作用。对于 NLRP3 炎症小体的非经典信号通路是由 caspase-11 介导的，革兰氏阴性杆菌的脂多糖（LPS）或病菌进入胞质激活 caspase-11，从而促进细胞发生炎症性焦亡，增强 caspase-1 的活化，增加 IL-1β 和 IL-18 的成熟释放 [23]，说明 caspase-11 是 NLRP3 炎症小体非经典信号通路的核心，由此激活效应对机体的生物效应和损伤更大，然而，目前对于 caspase-11 激活的机制还需进一步明确。

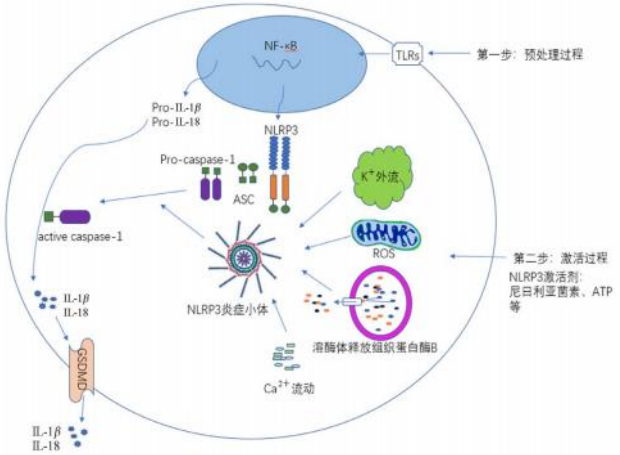


图 1 NLRP3 炎症小体经典活化信号通路

Fig 1 Classic activation signaling pathway of NLRP3 inflammasome

2 NLRP3 炎症小体的活化促进肿瘤的发生和发展

IL-1β在肿瘤的发生和发展中扮演着重要角色，包括激活细胞抗凋亡机制、驱动慢性炎症反应、促进肿瘤血管生成、诱导骨髓来源的抑制性细胞（myeloid-derived suppressor cells，MDSC）的产生、促进肿瘤细胞的侵袭和转移[24]，因此，IL-1β成为诱发肿瘤的关键因子，而在肿瘤微环境中，恶性细胞及浸润的免疫细胞又可分泌 IL-1β，进一步影响肿瘤的发生和发展、迁移侵袭及肿瘤免疫抑制。有研究发现，化疗药物吉西他滨和 5-氟尿嘧啶在治疗过程中能诱导组织蛋白酶 B 释放，促进 NLRP3 炎症小体的活化，减弱药物的化疗效果，而联合 IL-1β受体拮抗剂可增强化疗效果[25]。由此可见，抑制 NLRP3 炎症小体的活化有望成为肿瘤治疗的新靶点。接下来以具体的肿瘤类型，介绍 NLRP3 炎症小体在其中的调控作用。

2.1 NLRP3 炎症小体与肺癌

肺癌是近几年发病率和病死率增长最快、对人体生命威胁最大的恶性肿瘤之一。NLRP3 炎症小体的异常活化会介导肺癌进展，研究表明肺癌的发展与肺部菌群改变和炎症反应相关，共生菌群可通过激活 MyD88 通路，诱导髓系细胞产生 IL-1β及 IL-23，从而促进肺部 γδT 细胞的增殖与活化、中性粒细胞浸润，促进肺部肿瘤发展[26]。在肺癌组织中 NLRP3 炎症小体成分 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的表达均高于邻近正常组织[27]。通过抑制 IL-18 和 IL-1β细胞因子的分泌能抑制肺腺癌细胞系 A549 的增殖[28]，说明靶向抑制 NLRP3 炎症小体的活化可能对肺癌治疗具有潜力。而在 2010 年启动的 CANTOS（Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study）研究中意外发现 300 mg 卡那单抗（canakinumab）能使肺癌相对发病率降低 67%，病死率降低 77%[29]，首次发现靶向抑制 IL-1β的抗炎治疗具有显著改善肺癌的作用，由于 CANTOS 研究并不是为检测癌症治疗效果而设计的，因此该项研究报道的关于肺癌的治疗结果还需要在特定的临床试验中重复才能正式得出结论。但通过该项临床试验数据对卡那单抗进行前瞻性评估是值得的，可将其作为肺癌的治疗药物，也可与放疗或其他免疫调节疗法相结合从而高效治疗肺癌，其有效性强，因此无论用于早期癌症预防还是中晚期癌症治疗，对患者而言都意义重大。需要指出的是，使用该药后出现严重不良反应的患者比例与安慰剂组相当。二氧化硅和石棉等物质会诱导 NLRP3 炎症小体活化，促进 caspase-1 和 IL-1β的成熟与释放，当用二氧化硅和石棉处理时，与野生型小鼠相比，NLRP3 缺陷型小鼠的肺癌细胞明显减少[30-31]。红景天苷通过 AMPK 依赖的 NLRP3 炎症小体的抑制作用而限制非小细胞肺癌细胞增殖[32]，而多西环素、银杏内酯 B 也能抑制 NLRP3 炎症小体的活化而抑制肺癌细胞的增殖[33-34]，说明 NLRP3 炎症小体有望成为治疗肺癌的一个潜在靶点。

2.2 NLRP3 炎症小体与头颈部鳞状细胞癌

头颈部鳞状细胞癌（squamous cell carcinoma of the head and neck，SCCHN）是世界上较常见的癌症。在自发性 SCCHN 小鼠模型上发现 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达明显增高，并且其表达与肿瘤微环境中骨髓来源的抑制性细胞、调节性 T 细胞和巨噬细胞的数量成正相关[35]，当这些免疫抑制性细胞在肿瘤微环境中积累时，会削弱 T 细胞的反应性而促进肿瘤发生和发展[36]。此外，由于 NLRP3 炎症小体被激活后会产生 IL-1β以形成炎性微环境促进肿瘤的进行性发展，并进一步活化 NLRP3 炎症小体释放更多的 IL-1β。研究发现，抑制 SCCHN 小鼠模型 NLRP3 炎症小体的活化会抑制 IL-1β的水平，减少骨髓来源的抑制性细胞、调节性 T 细胞和肿瘤相关巨噬细胞的数量，增加小鼠体内 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的数量，增强机体免疫反应，从而抑制肿瘤发生[35]，表明 NLRP3 炎症小体可能成为治疗 SCCHN 的潜在新靶标。

口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinoma，OSCC）属于 SCCHN 中最常见和高发的一种恶性肿瘤，我国 OSCC 患者的五年生存率不足 50%，因此对于 OSCC 的治疗目前面临着巨大的挑战。有研究发现在 OSCC 患者和动物模型中 NLRP3 炎症小体相关成分表达明显上调[37]，通过 LPS 和 ATP 激活 NLRP3 炎性小体后能增强 OSCC 肿瘤细胞的成球和克隆形成能力，并且在 OSCC 患者的外周血中 IL-1β的浓度明显高于健康人[38]。当机体免疫功能失调时，存在于口腔的白假丝酵母菌分泌念珠菌毒素，该毒素会促进钾离子外流活化 NLRP3 炎症小体，从而促进白假丝酵母菌的黏附和生物膜形成，加速 OSCC 的发生，当沉默 *NLRP3* 基因后会抑制 OSCC 肿瘤细胞的增殖和淋巴转移[39]。OSCC 肿瘤细胞内的 NLRP3 的表达受到 microRNA-22 的调控，microRNA-22 的水平显著低于邻近的正常口腔黏膜组织，但 NLRP3 的表达在 OSCC 肿瘤组织

中的表达却明显升高，而当 microRNA-22 在 OSCC 肿瘤细胞系中过表达时，NLRP3 的基因和蛋白质水平均会显著降低，表明 microRNA-22 靶向 OSCC 肿瘤细胞内 NLRP3 而抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭转移。随着研究的深入，发现 NLRP3 炎症小体会影响 OSCC 的化疗效果，对 5- 氟尿嘧啶耐药性高的 OSCC 肿瘤细胞内 NLRP3 炎症小体的表达明显升高，当抑制 NLRP3 炎症小体信号通路时，可以改善 5- 氟尿嘧啶对 OSCC 患者的化疗效果 [40]。由此可见，通过 NLRP3 炎性小体 /IL-1β 途径抑制肿瘤微环境可有效预防、控制和治疗 OSCC。

2.3 NLRP3 炎症小体与子宫内膜癌

子宫内膜癌是女性恶性肿瘤，发病逐渐呈现年轻化趋势，流行病学研究发现炎症在子宫内膜癌的发生发展中扮演重要角色。有研究表明，NLRP3 炎症小体相关蛋白表达的上调与子宫内膜癌的进展和不良预后有关，NLRP3 的表达与子宫内膜癌的临床和病理分级成正相关，当沉默 NLRP3 后可降低 IL-1β 和 caspase-1 的表达并抑制子宫内膜癌细胞的增殖、迁移和侵袭，而过表达 NLPR3 后则出现相反的结果。研究还发现雌激素会增强 NLPR3、IL-1β 的表达，并促进子宫内膜癌细胞的增殖，当使用雌激素受体 β 抑制剂后可以逆转上述结果 [41]，说明 NLRP3 炎症小体可能是子宫内膜癌治疗的新靶点。然而，有研究表明用氢预处理后能通过激活 ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路介导的细胞焦亡抑制子宫内膜癌细胞的增殖 [42]。在动物实验中，当小鼠补充足量的氢后，能减轻移植性子宫内膜肿瘤的重量，并缩小肿瘤体积。由于 NLRP3 和子宫内膜癌的相关研究目前较少，所以 NLRP3 炎症小体活化后在何种条件下发挥促癌或抑癌作用还需进一步研究。

3 NLRP3 炎症小体抑制剂在抗肿瘤中的作用

随着对 NLRP3 炎症小体研究的深入，越来越多的 NLRP3 炎症小体抑制剂被发现（见表 1）。这些抑制剂主要是通过调控 NLRP3 炎症小体的预处理阶段（NF-κB 信号通路）、活化的上游阶段（如 ROS 释放、氯离子外流等）、NLRP3 的翻译后修饰和 NLRP3 炎症小体的组装来实现的。接下来重点介绍一些 NLRP3 炎症小体抑制剂在肿瘤中的作用。

表 1 NLRP3 炎症小体抑制剂及其作用机制

Tab 1 NLRP3 inflammasome inhibitors and its mechanism

名称	作用机制
β- 羟基丁酸 [43]	抑制 K 离子外流，抑制 ASC 的寡聚化和 ASC 斑点的形成
ω-3 脂肪酸 [44]	促进 ARRB2 与 NLRP3 相互作用，从而抑制 NLRP3 炎症小体活化
多巴胺 [45]	增强 NLRP3 泛素化，促进 NLRP3 的降解
黄体酮 [46]	增强自噬，促进 NLRP3 的降解
褪黑素 [47]	抑制 NLRP3 的表达
衣康酸 [48]	抑制 Pro-IL-1β 的表达，抑制 GSDMD 的活化
MNS[49]	与 NLRP3 的 LRR 和 NACHT 结构域结合，从而抑制 NLRP3 的 ATP 酶活性
Bay11-7082[50]	烷基化 NLRP3 的 NACHT 结构域中的半胱氨酸，从而抑制 NLRP3 的 ATP 酶活性
多巴胺 D1 受体激动剂 A-68930[51]	激活自噬促进 NLRP3 的降解
INF39[52]	抑制 NLRP3 ATP 酶活性，抑制 NF-κB 通路
OLT1177[53]	抑制 NLRP3 的 ATP 酶活性，阻断 NLRP3 炎症小体的组装
CY-09[54]	直接与 NLRP3 的 NACHT 结构域结合，抑制 NLRP3 的 ATP 酶活性
FC11A-2[55]	干扰 Pro-caspase-1 的剪切成熟，抑制 IL-1β/18 的成熟
普鲁士蓝纳米酶 [56]	抑制 Pro-IL-1β 的表达，抑制 GSDMD 的活化
16673-34-0[57]	抑制 ASC 的寡聚化
JC-124[58]	阻断 ASC 聚集、caspase-1 活化和 IL-1β 分泌
JC-171[59]	抑制 NLRP3-ASC 的结合
BOT-4-one[60]	直接与 NLRP3 结合，抑制其 ATP 酶活性
白藜芦醇类似物（IRA；C33）[61]	抑制线粒体 ROS 和 DNA 释放
MCC950[62]	直接与 NLRP3 的 Walker B 位点结合，抑制 NLRP3 的 ATP 酶活性
RRX-001[63]	直接与 NLRP3 结合，抑制 NLRP3 和 NEK7 的结合
查尔酮类似物 [64]	抑制线粒体 ROS 的释放
甘草查尔酮 B[65]	直接与 NEK7 结合进而抑制 NEK7 和 NLRP3 的结合
大黄酸 [66]	抑制 ASC、NLRP3 的表达和 NLRP3 炎症小体的组装

续表 1

名称	作用机制
环黄芪醇[67]	抑制组装和 GSDMD 诱导的细胞焦亡
萝卜硫素[68]	抑制线粒体 ROS 的生成
白藜芦醇[69]	抑制 NF-κB 信号通路，激活自噬
冬凌草甲素[70]	与 NLRP3 的 NACHT 结构域直接结合，抑制 NLRP3 与 NEK7 的相互结合，进而抑制炎症小体的组装和活化
槲皮素[71]	增强线粒体自噬，抑制 NLRP3、ASC、caspase-1 的表达，抑制炎症小体的组装
厚朴酚[72]	抑制 ROS 的释放
汉黄芩苷[73]	抑制 ROS 的释放
小白菊内酯[74]	抑制 ASC 的磷酸化和 NF-κB 的转录入核
穿心莲内酯[75]	抑制 ROS 的产生
山莨菪碱[76]	抑制 NLRP3 的表达
紫檀芪[77]	抑制 NLRP3/caspase-1 通路
青蒿素[78]	抑制 NLRP3 和 ASC 蛋白的表达
银杏内酯 B[79]	抑制 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达
牛膝双齿多肽馏分（ABPPκ）[80]	抑制 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达
吲哚[81]	抑制 ROS 产生和钙离子外流
二氢杨梅素[82]	抑制 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达
四羟基二苯乙烯苷（TSG）[83]	通过 AMPK/PINK1/Parkin 信号通路增强线粒体自噬
4- 羟基壬烯醛[84]	直接竞争结合 NLRP3 进而抑制 NLRP3 和 NEK7 的结合
银杏叶提取物 EGb761[85]	激活自噬促进 NLRP3 炎症小体相关蛋白的降解
鸢尾素[86]	抑制 ROS 的释放
α- 硫辛酸[87]	抑制 NF-κB 信号通路的活化
丹参酮[88]	抑制线粒体 ROS 的释放
胡椒龙胺[89]	抑制 NLRP3 和 NEK7 的结合，抑制 NLRP3 的寡聚化
天麻素[90]	抑制 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达
别嘌醇[91]	抑制 NLRP3 和 ASC 蛋白的表达
氟芬那酸[92]	抑制氯离子外流，从而抑制 NLRP3 炎症小体活化
氟西汀[93]	抑制 ROS 产生，从而抑制 NLRP3 炎症小体的活化
曲尼司特[94]	直接与 NLRP3 的 NACHT 结构域结合，抑制 NLRP3 的寡聚化
吲哚美辛[95]	抑制 IL-1β 和 caspase-1 的表达
格列本脲[96]	抑制钾离子外流
依达拉奉[97]	抑制线粒体 ROS 的释放
多奈哌齐[98]	抑制 NF-κB 的活化，抑制 NLRP3 和 IL-1β 的表达
更昔洛韦[99]	抑制 NF-κB 的活化
沙利度胺[100]	抑制 NF-κB 的活化，抑制 NLRP3 的表达
二甲双胍[101]	抑制线粒体 ATP 和 DNA 合成
罗格列酮[102]	抑制 NLRP3 炎症小体相关蛋白的合成
环吡酮胺[103]	抑制线粒体 ROS 的释放，增加线粒体膜电位
氯喹那多[104]	抑制线粒体 ROS 的释放，抑制 ASC 的寡聚化水平以及 ASC 和 NLRP3 的结合
双硫仑[105]	抑制 ROS 的产生和抑制组织蛋白酶 B 的释放，抑制 GSDMD 的活化

β- 羟基丁酸是一种酮体，被视为一种可替代的能量来源物质，可以在机体禁食和长时间运动期间为大脑及周围组织提供 ATP。β- 羟基丁酸能通过抗氧化、抗衰老等机制保护中枢神经系统，对抗卒中、帕金森病和阿尔茨海默病等。与健康组织不同，癌细胞无法有效利用酮体获取能量，主要是依赖葡萄糖作为主要能量来源，而肿瘤患者本身需要摄入更多脂肪和蛋白质，酮体饮食疗法就是为肿瘤患者提供足够能产生酮体的脂肪和蛋白质，而限制葡萄糖摄入的方法，酮体饮食主要是利用肿瘤细胞线粒体缺陷、葡萄糖依赖的特征，通过抑制炎症、加强免疫反应、提高抗氧化应激能力、调节相关信号通路蛋白表达等多种途径来抑制肿瘤生长，改善患者的生活质量，延长患者生存期，同时还能增强放化疗的敏感性。研究表明，补充酮体能降低体外生长的高转

移性 VM-M3 癌细胞的增殖活力，即使高浓度的葡萄糖也不影响其结果，通过酮体饲养 VM/DK 系统性转移癌小鼠，可以延长小鼠的生存期，并且发现该抗肿瘤作用与机体葡萄糖或能量水平无关[106]，而随着对 β- 羟基丁酸的深入研究，发现其能够减少单核细胞 NLRP3 炎症小体活化介导的 IL-1β 和 IL-18 的释放，减轻炎症反应[107]，这说明酮体饮食抗肿瘤效应可能与 β- 羟基丁酸抑制 NLRP3 炎症小体介导的炎症反应有关。

萝卜硫素是从十字花科植物中提取的一种天然产物，对包括胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、宫颈癌和结直肠癌在内的多种肿瘤具有抗肿瘤活性。其在癌症的各个演化阶段均具有抗肿瘤活性，对各阶段的抗肿瘤机制也不尽相同，细胞色素 P450 系统（CYP450）的Ⅰ相酶会将一些毒性物质转化为致癌物，萝卜硫素可以直接抑制Ⅰ相酶的活性，此外，其还能在癌症起始阶段通过抗氧化剂反应元件驱动的基因（如 NADPH）调节Ⅱ相酶活性[108]，促进多种体内有毒代谢产物排泄，以保护机体免受致癌作用，萝卜硫素还具有抑制 DNA 突变的作用，以防止基因突变导致癌症的发生。在癌症演变阶段，萝卜硫素能通过调控细胞周期将癌细胞停滞在 G_2、M 和 S 期，还可通过抑制血管新生和内皮细胞有丝分裂进而抑制肿瘤的发展[109]。萝卜硫素具有抑制 NLRP3 炎症小体活化的作用，其抑制肿瘤发生发展的作用是否与抑制 NLRP3 炎症小体活化相关还需进一步的研究予以明确。

冬凌草甲素是从唇形花科香茶菜属植物中提取出来的一种天然活性物质，其对白血病、肝癌、乳腺癌和黑色素瘤等恶性肿瘤具有良好的抵抗效果，能够抵抗诱变剂对基因的诱导突变作用，主要是通过阻断诱变剂与细胞内的特异性部位结合，或者在诱变剂还未进入到细胞时就消除了该诱变剂的诱导突变能力。冬凌草甲素还能抑制肿瘤细胞的增殖，诱导肿瘤细胞的凋亡，抑制肿瘤细胞相关蛋白质的合成。冬凌草甲素不仅能阻滞肿瘤细胞增殖周期还能抑制肿瘤细胞端粒酶活性，从而发挥遏制肿瘤细胞无限增殖的作用。在诱导肿瘤细胞凋亡方面，冬凌草甲素能够对磷脂酰肌醇 3- 激酶、转化生长因子等靶蛋白基因的表达进行调控，激活 PI3K/Akt 信号通路而显著诱导肿瘤细胞的凋亡。冬凌草甲素还能辅助增强抗肿瘤药物的疗效，减少抗肿瘤药物的使用剂量以减少抗肿瘤药物引起的不良反应。抗肿瘤药物的耐药性是导致肿瘤化疗失败的主要原因，研究发现冬凌草甲素能够逆转肿瘤细胞的耐药性，提高肿瘤细胞对化疗药物的抗肿瘤敏感性，增强药物的抗肿瘤效果。冬凌草甲素是一个高效且特异的 NLRP3 炎症小体抑制剂，对因 NLRP3 炎症小体异常活化导致的痛风、腹膜炎和 2 型糖尿病具有改善作用[70]，而其抗肿瘤作用是否与抑制 NLRP3 炎症小体活化还需进行深入研究。

4 挑战与展望

毒性反应及耐药性是肿瘤化疗失败的主要原因，随着肿瘤医学研究的发展，抗肿瘤药物的开发方向逐渐针对肿瘤分子靶标进行，因此开发出安全高效的小分子抗肿瘤药物尤为重要。炎症反应被认为在肿瘤的发生发展中起着决定性作用，炎症小体能识别病原或危险信号进而驱动炎症反应，作为炎症小体家族的一员，NLRP3 是研究得最多、最全面的一个炎症小体，已被证明与多种炎症性疾病有关。越来越多的研究指出 NLRP3 炎症小体可能在肿瘤的发生中发挥着核心作用，并作为一种潜在的抗肿瘤靶点引起了人们的广泛关注。本综述讨论了 NLRP3 炎症小体在肺癌、SCCNH、子宫内膜癌中的作用，并详细总结了近年来研究发现的 NLRP3 炎症小体抑制剂及其作用机制，阐述了 NLRP3 炎症小体抑制剂与相关肿瘤的影响。本综述重点指出靶向抑制 NLRP3 炎症小体治疗肿瘤的潜在作用，为指导开发相关新药提供理论依据。

针对 NLRP3 炎症小体开发新型抗肿瘤药物，有望取得重大突破性进展，而找到选择性抑制 NLRP3 炎症小体活化的高活性药物，对控制相关肿瘤的形成和进展有重要的作用。研究人员和一些制药公司正积极开发具有潜在治疗价值的 NLRP3 炎症小体抑制剂。最初，大多数开发的 NLRP3 炎症小体抑制剂是为了阻止炎性细胞因子的产生，而目前的开发策略主要集中在直接结合和干扰 NLRP3 蛋白上，或者是调节炎症小体蛋白翻译后修饰或降解的靶蛋白上。然而，由于发现的 NLRP3 炎症小体抑制剂的抑制活性弱或特异性低或者毒副作用强等原因，目前尚未有 NLRP3 炎症小体抑制剂被批准用于临床。因此，高效特异低毒性的 NLRP3 炎症小体抑制剂是未来肿瘤治疗药物开发的重点，而一些天然及合成的 NLRP3 炎症小体特异性抑制剂的发现都有助于药物的进一步开发，通过对有效的小分子化合物进行结构改造，增强其药理作用和理化性质，

或者是对临床中具有抗炎作用的老药进行再研究开发，有望为相关肿瘤的治疗提供新的思路，此外，针对 NLRP3 炎症小体信号通路进行更深入的研究，开发调控 NLRP3 炎症小体活化的新靶点，也能为开发高效特异的 NLRP3 炎症小体抑制剂提供新的方向。

总而言之，NLRP3 炎症小体的异常活化能介导肿瘤的发生发展，然而在研究过程中还需充分考虑肿瘤的发生背景、分期和类型，并针对 NLRP3 炎症小体激活的每个步骤，采用适当的动物模型，深入剖析 NLRP3 炎症小体在各种肿瘤细胞和转基因动物模型中的作用，这对于开发出有效治疗特定肿瘤的 NLRP3 炎症小体抑制剂具有重要意义。

参考文献

[1] Singh R，Mishra MK，Aggarwal H. Inflammation，immunity，and cancer [J]. Mediators Inflamm，2017，2017：6027305.

[2] Deb G，Cicala A，Papadas A，et al. Matrix proteoglycans in tumor inflammation and immunity [J]. Am J Physiol Cell Physiol，2022，323（3）：C678-C693.

[3] Zhao HK，Wu L，Yan GF，et al. Inflammation and tumor progression：signaling pathways and targeted intervention [J]. Signal Transduct Target Ther，2021，6（1）：263.

[4] Hanahan D，Weinberg RA. Hallmarks of cancer：the next generation [J]. Cell，2011，144（5）：646-674.

[5] Kantono M，Guo BC. Inflammasomes and cancer：the dynamic role of the inflammasome in tumor development [J]. Front Immunol，2017，8：1132.

[6] Thi HTH，Hong S. Inflammasome as a therapeutic target for cancer prevention and treatment [J]. J Cancer Prev，2017，22（2）：62-73.

[7] Yi YS. Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases [J]. Korean J Physiol Pharmacol，2018，22（1）：1-15.

[8] Yang CA，Chiang BL. Inflammasomes and human autoimmunity：a comprehensive review [J]. J Autoimmun，2015，61：1-8.

[9] Freeman LC，Ting JP. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases [J]. J Neurochem，2016，136：29-38.

[10] Song LM，Pei L，Yao SL，et al. NLRP3 Inflammasome in neurological diseases，from functions to therapies [J]. Front Cell Neurosci，2017，11：63.

[11] Rovira-Llopis S，Apostolova N，Banuls C，et al. Mitochondria，the NLRP3 Inflammasome，and sirtuins in type 2 diabetes：new therapeutic targets [J]. Antioxid Redox Signal，2018，29（8）：749-791.

[12] Orecchioni M，Kobiyama K，Winkels H，et al. Olfactory receptor 2 in vascular macrophages drives atherosclerosis by NLRP3-dependent IL-1 production [J]. Science，2022，375（6577）：214-221.

[13] Duewell P，Kono H，Rayner KJ，et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. Nature，2010，464（7293）：1357-1361.

[14] Sharma D，Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes：mechanisms of inflammasome activation and regulation [J]. J Cell Biol，2016，213（6）：617-629.

[15] Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease [J]. Cardiovasc Res，2022，118（2）：372-385.

[16] Di Virgilio F，Dal Ben D，Sarti AC，et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation [J]. Immunity，2017，47（1）：15-31.

[17] Zhang YF，Rong H，Zhang FX，et al. A membrane potential-and calpain-dependent reversal of caspase-1 inhibition regulates canonical NLRP3 inflammasome [J]. Cell Rep，2018，24（9）：2356-2369 e2355.

[18] Katsnelson MA，Rucker LG，Russo HM，et al. K^+ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca^{2+} signaling [J]. J Immunol，2015，194（8）：3937-3952.

[19] Lee GS，Subramanian N，Kim AI，et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and Camp [J]. Nature，2012，492（7427）：123-127.

[20] Billingham LK，Stoolman JS，Vasan K，et al. Mitochondrial electron transport chain is necessary for NLRP3 inflammasome activation [J]. Nat Immunol，2022，23（5）：692-704.

[21] Bai H，Yang B，Yu WF，et al. Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome [J]. Exp Cell Res，2018，362（1）：180-187.

[22] Duewell P，Kono H，Rayner KJ，et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. Nature，464（7293）：1357-1361.

[23] Xue YS，Enosi TD，Tan WH，et al. Emerging activators and regulators of inflammasomes and pyroptosis [J]. Trends Immunol，2019，40（11）：1035-1052.

[24] Mantovani A，Barajon I，Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy [J]. Immunol Rev，2018，281（1）：57-61.

[25] Bruchard M，Mignot G，Derangere V，et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth [J]. Nat Med，2013，19（1）：57-64.

[26] Jin CC，Lagoudas GK，Zhao C，et al. Commensal microbiota promote lung cancer development via $\gamma\delta$ T cells [J]. Cell，2019，176（5）：998-1013. e16.

[27] Kong H，Wang YL，Zeng XN，et al. Differential expression of inflammasomes in lung cancer cell lines and tissues [J]. Tumour Biol，2015，36（10）：7501-7513.

[28] Wang YL，Kong H，Zeng XN，et al. Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells [J]. Oncol Rep，2016，35（4）：2053-2064.

[29] Ridker PM，MacFadyen JG，Thuren T，et al. Effect of interleukin-1β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis：exploratory results from a randomised，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Lancet，2017，390（10105）：1833-1842.

[30] Cao ZW，Fang YL，Lu YH，et al. Exposure to nickel oxide nanoparticles induces pulmonary inflammation through NLRP3 inflammasome activation in rats [J]. Int J Nanomedicine，2016，11：3331-3346.

[31] Sayan M，Mossman BT. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases [J]. Part Fibre Toxicol，2016，13（1）：51.

[32] Ma WD，Wang ZY，Zhao Y，et al. Salidroside suppresses the proliferation and migration of human lung cancer cells through AMPK-dependent NLRP3 inflammasome regulation [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：6614574.

[33] Alsaadi M，Tezcan G，Garanina EE，et al. Doxycycline attenuates cancer cell growth by suppressing NLRP3-mediated inflammation [J]. Pharmaceuticals（Basel），2021，14（9）：852.

[34] Wang X，Shao QH，Zhou H，et al. Ginkgolide B inhibits lung cancer cells promotion via beclin-1-dependent autophagy [J]. BMC Complement Med Ther，2020，20（1）：194.

[35] Chen L，Huang CF，Li YC，et al. Blockage of the NLRP3 inflammasome by MCC950 improves anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cell Mol Life Sci，2018，75（11）：2045-2058.

[36] Gajewski TF，Woo SR，Zha YY，et al. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment [J]. Curr Opin Immunol，2013，25（2）：268-276.

[37] Moossavi M，Parsamanesh N，Bahrami A，et al. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer [J]. Mol Cancer，2018，17（1）：158.

[38] Singh P，Augustine D，Rao RS，et al. Interleukin-1beta and Caspase-3 expression serve as independent prognostic markers for metastasis and survival in oral squamous cell carcinoma [J]. Cancer Biomark，2019，26（1）：109-122.

[39] Engku Nasrullah Satiman EAF，Ahmad H，Ramzi AB，et al. The role of Candida albicans candidalysin ECE1 gene in oral carcinogenesis [J]. J Oral Pathol Med，2020，49（9）：835-841.

[40] Feng XD，Luo QQ，Zhang H，et al. The role of NLRP3 inflammasome in 5-fluorouracil resistance of oral squamous cell carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res，2017，36（1）：81.

[41] Liu SG，Wu XX，Hua T，et al. NLRP3 inflammasome activation by estrogen promotes the progression of human endometrial cancer [J]. Onco Targets Ther，2019，12：6927-6936.

[42] Yang Y，Liu PY，Bao W，et al. Hydrogen inhibits endometrial cancer growth via a ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptotic pathway [J]. BMC Cancer，2020，20（1）：28.

[43] Trotta MC，Maisto R，Guida F，et al. The activation of retinal HCA2 receptors by systemic beta-hydroxybutyrate inhibits diabetic retinal damage through reduction of endoplasmic reticulum stress and the NLRP3 inflammasome [J]. PLoS One，2019，14（1）：e0211005.

[44] Lin C，Chao HL，Li Z，et al. Omega-3 fatty acids regulate NLRP3 inflammasome activation and prevent behavior deficits after traumatic brain injury [J]. Exp Neurol，2017，290：115-122.

[45] Yan YQ，Jiang W，Liu L，et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. Cell，2015，160（1-2）：62-73.

[46] Hong Y，Liu YJ，Yu DZ，et al. The neuroprotection of progesterone against Aβ-induced NLRP3-Caspase-1 inflammasome activation via enhancing autophagy in astrocytes [J]. Int Immunopharmacol，2019，74：105669.

[47] Xiong XY，Bao ZK，Mi YH，et al. Melatonin alleviates neonatal necrotizing enterocolitis by repressing the activation of the NLRP3 inflammasome [J]. Gastroenterol Res Pract，2022，2022：6920577.

[48] Peace CG，O'Neill LA. The role of itaconate in host defense and inflammation [J]. J Clin Invest，2022，132（2）：e148548.

[49] Xiao MJ，Li LG，Li CX，et al. 3，4-Methylenedioxy-β-nitrostyrene ameliorates experimental burn wound progression by inhibiting the NLRP3 inflammasome activation [J]. Plast Reconstr Surg，2016，137（3）：566e-575e.

[50] Zhang AL，Wang K，Ding LH，et al. Bay11-7082 attenuates neuropathic pain via inhibition of nuclear factor-kappa B and nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 inflammasome activation in dorsal root ganglions in a rat model of lumbar disc herniation [J]. J Pain Res，2017，10：375-382.

[51] Cheng ZY，Xia QP，Hu YH，et al. Dopamine D1 receptor agonist A-68930 ameliorates Aβ1-42-induced cognitive impairment and neuroinflammation in mice [J]. Int Immunopharmacol，2020，88：106963.

[52] Pellegrini C，Fornai M，Colucci R，et al. A comparative study on the efficacy of NLRP3 inflammasome signaling inhibitors in a pre-clinical model of bowel inflammation [J]. Front Pharmacol，2018，9：1405.

[53] Sanchez-Fernandez A，Skouras DB，Dinarello CA，et al. OLT1177（Dapansutrile），a selective NLRP3 inflammasome inhibitor，ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis [J]. Front Immunol，2019，10：2578.

[54] Jiang H，He HB，Chen Y，et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders [J]. J Exp Med，2017，214（11）：3219-3238.

[55] Liu W，Guo WJ，Wu J，et al. A novel benzo[d]imidazole derivate prevents the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. Biochem Pharmacol，2013，85（10）：1504-1512.

[56] Ma XX，Hao JN，Wu JR，et al. Prussian blue nanozyme as a pyroptosis inhibitor alleviates neurodegeneration [J]. Adv Mater，2022，34（15）：e2106723.

[57] Marchetti C，Chojnacki J，Toldo S，et al. A novel pharmacologic inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury after ischemia-reperfusion in the mouse [J]. J Cardiovasc Pharmacol，2014，63（4）：316-322.

[58] Yin J，Zhao FP，Chojnacki JE，et al. NLRP3 inflammasome inhibitor ameliorates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer’s disease [J]. Mol Neurobiol，2018，55（3）：1977-1987.

[59] Guo CQ，Fulp JW，Jiang YQ，et al. Development and characterization of a hydroxyl-sulfonamide analogue，5-chloro-*N*-[2-（4-hydroxysulfamoyl-phenyl）-ethyl]-2-methoxy-benzamide，as a novel NLRP3 inflammasome inhibitor for potential treatment of multiple sclerosis [J]. ACS Chem Neurosci，2017，8（10）：2194-2201.

[60] Shim DW，Shin WY，Yu SH，et al. BOT-4-one attenuates NLRP3 inflammasome activation：NLRP3 alkylation leading to the regulation of its ATPase activity and ubiquitination [J]. Sci Rep，2017，7（1）：15020.

[61] Chen YR，Zheng ZH，Li C，et al. Synthetic imine resveratrol analog 2-methoxyl-3，6-dihydroxyl-IRA ameliorates colitis by activating protective Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 expression [J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019：7180284.

[62] Coll RC，Hill JR，Day CJ，et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition [J]. Nat Chem Biol，2019，15（6）：556-559.

[63] Chen Y，He HB，Lin BL，et al. RRx-001 ameliorates inflammatory diseases by acting as a potent covalent NLRP3 inhibitor [J]. Cell Mol Immunol，2021，18（6）：1425-1436.

[64] Zhang C，Yue H，Sun P，et al. Discovery of chalcone analogues as novel NLRP3 inflammasome inhibitors with potent anti-inflammation activities [J]. Eur J Med Chem，2021，219：113417.

[65] Li Q，Feng H，Wang HB，et al. Licochalcone B specifically inhibits the NLRP3 inflammasome by disrupting NEK7-NLRP3 interaction [J]. EMBO Rep，2022，23（2）：e53499.

[66] Chen YJ，Tang ZZ，Du L，et al. A novel compound AB-38b improves diabetes-associated cognitive decline in mice via activation of Nrf2/ARE pathway [J]. Brain Res Bull，2019，150：160-167.

[67] Deng GL，Chen WJ，Wang P，et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in macrophage by cycloastragenol contributes to amelioration of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice [J]. Int Immunopharmacol，2019，74：105682.

[68] Yu C，He Q，Zheng J，et al. Sulforaphane improves outcomes and slows cerebral ischemic/reperfusion injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in rats [J]. Int Immunopharmacol，2017，45：74-78.

[69] Qi Y，Shang L，Liao ZZ，et al. Intracerebroventricular injection of resveratrol ameliorated Aβ-induced learning and cognitive decline in mice [J]. Metab Brain Dis，2019，34（1）：257-266.

[70] He H，Jiang HB，Chen Y，et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity [J]. Nat Commun，2018，9（1）：2550.

[71] Han XJ，Xu TS，Fang QJ，et al. Quercetin hinders microglial activation to alleviate neurotoxicity via the interplay between NLRP3 inflammasome and mitophagy [J]. Redox Biology，2021，44：102010.

[72] Liu X，Wang YA，Wu D，et al. Magnolol prevents acute alcoholic liver damage by activating PI3K/Nrf2/PPARγ and inhibiting NLRP3 signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2019，10：1459.

[73] Pandey MK，Sung B，Ahn KS，et al. Gambogic acid，a novel ligand for transferrin receptor，potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway [J]. Blood，2007，110（10）：3517-3525.

[74] Ou YT，Sun P，Wu NN，et al. Synthesis and biological evaluation of parthenolide derivatives with reduced toxicity as potential inhibitors of the NLRP3 inflammasome [J]. Bioorg Med Chem Lett，2020，30（17）：127399.

[75] Peng S，Gao J，Liu W，et al. Andrographolide ameliorates OVA-induced lung injury in mice by suppressing ROS-mediated NF-κB signaling and NLRP3 inflammasome activation [J]. Oncotarget，2016，7（49）：80262-80274.

[76] Li P，Liu Y，He Q. Anisodamine suppressed the growth of hepatocellular carcinoma cells，induced apoptosis and regulated the levels of inflammatory factors by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Drug Des Devel Ther，2020，14：1609-1620.

[77] Li QS，Chen L，Liu XW，et al. Pterostilbene inhibits amyloid-β-induced neuroinflammation in a microglia cell line by inactivating the NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway [J]. J Cell Biochem，2018，119（8）：7053-7062.

[78] Wang FY，Gao QP，Yang J，et al. Artemisinin suppresses myocardial ischemia-reperfusion injury via NLRP3 inflammasome mechanism [J]. Mol Cell Biochem，2020，474（1-2）：171-180.

[79] Zhang YD，Zhao Y，Zhang J，et al. Ginkgolide B inhibits NLRP3 inflammasome activation and promotes microglial M2 polarization in Aβ1-42-induced microglia cells [J]. Neurosci Lett，2021，764：136206.

[80] Ge XY，Wang YT，Yu S，et al. Anti-inflammatory activity of a polypeptide fraction from achyranthes bidentate in amyloid β oligomers induced model of Alzheimer’s disease [J]. Front Pharmacol，2021，12：716177.

[81] Austad SN，Ballinger S，Buford TW，et al. Targeting whole body metabolism and mitochondrial bioenergetics in the drug development for Alzheimer’s disease [J]. Acta Pharm Sin B，2022，12（2）：511-531.

[82] Feng J，Wang JX，Du YH，et al. Dihydromyricetin inhibits microglial activation and neuroinflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation in APP/PS1 transgenic mice [J]. CNS Neurosci The，2018，24（12）：1207-1218.

[83] Gao Y，Li JT，Li JP，et al. Tetrahydroxy stilbene glycoside alleviated inflammatory damage by mitophagy via AMPK related PINK1/Parkin signaling pathway [J]. Biochem Phar-

macol，2020，177：113997.
[84] Hsu CG，Chavez CL，Zhang C，et al. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits NLRP3 inflammasome activation and macrophage pyroptosis [J]. Cell Death Differ，2022，29（9）：1790-1803.
[85] Liu X，Hao WL，Qin YR，et al. Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease [J]. Brain Behav Immun，2015，46：121-131.
[86] Pang Q，Wang PW，Pan YJ，et al. Irisin protects against vascular calcification by activating autophagy and inhibiting NLRP3-mediated vascular smooth muscle cell pyroptosis in chronic kidney disease [J]. Cell Death Dis，2022，13（3）：283.
[87] Kim SM，Ha JS，Han AR，et al. Effects of α-lipoic acid on LPS-induced neuroinflammation and NLRP3 inflammasome activation through the regulation of BV-2 microglial cells activation [J]. BMB Rep，2019，52（10）：613-618.
[88] Yue H，Yang ZJ，Ou YT，et al. Tanshinones inhibit NLRP3 inflammasome activation by alleviating mitochondrial damage to protect against septic and gouty inflammation [J]. Int Immunopharmacol，2021，97：107819.
[89] Shi J，Xia Y，Wang HH，et al. Piperlongumine is an NLRP3 inhibitor with anti-inflammatory activity [J]. Front Pharmacol，2022，12：818326.
[90] Yang F，Li GZ，Lin B，et al. Gastrodin suppresses pyroptosis and exerts neuroprotective effect in traumatic brain injury model by inhibiting NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. J Integr Neurosci，2022，21（2）：72.
[91] Ding XQ，Wu WY，Jiao RQ，et al. Curcumin and allopurinol ameliorate fructose-induced hepatic inflammation in rats via miR-200a-mediated TXNIP/NLRP3 inflammasome inhibition [J]. Pharmacol Res，2018，137：64-75.
[92] Daniels MJ，Rivers-Auty J，Schilling T，et al. Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer’s disease in rodent models [J]. Nat Commun，2016，7：12504.
[93] Li JR，Xu HZ，Nie S，et al. Fluoxetine-enhanced autophagy ameliorates early brain injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation following subrachnoid hemorrhage in rats [J]. J Neuroinflammation，2017，14（1）：186.
[94] Huang Y，Jiang H，Chen Y，et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases [J]. EMBO Mol Med，2018，10（4）：e8689.
[95] Karkhah A，Saadi M，Pourabdolhossein F，et al. Indomethacin attenuates neuroinflammation and memory impairment in an STZ-induced model of Alzheimer’s like disease [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol，2021，43（6）：758-766.
[96] Dwivedi DK，Jena GB. Glibenclamide protects against thioacetamide-induced hepatic damage in Wistar rat：investigation on NLRP3，MMP-2，and stellate cell activation [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2018，391（11）：1257-1274.
[97] Micaroni M，Stanley AC，Khromykh T，et al. Rab6a/a’are important Golgi regulators of pro-inflammatory TNF secretion in macrophages [J]. PLoS One，2013，8（2）：e57034.
[98] Kim J，Lee HJ，Park SK，et al. Donepezil regulates LPS and Aβ-stimulated neuroinflammation through MAPK/NLRP3 inflammasome/STAT3 signaling [J]. Int J Mol Sci，2021，22（19）：10637.
[99] Huang HD，Wang X，Zhang X，et al. Ganciclovir reduces irinotecan-induced intestinal toxicity by inhibiting NLRP3 activation [J]. Cancer Chemother Pharmacol，2020，85（1）：195-204.
[100]Li TH，Huang CC，Yang YY，et al. Thalidomide improves the intestinal mucosal injury and suppresses mesenteric angiogenesis and vasodilatation by down-regulating inflammasomes-related cascades in cirrhotic rats [J]. PLoS One，2016，11（1）：e0147212.
[101]Xian HX，Liu Y，Rundberg NA，et al. Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation [J]. Immunity，2021，54（7）：1463-1477. e11.
[102]Ma L，Ma Y，Ma BX，et al. Rosiglitazone ameliorates acute hepatic injury via activating the Nrf2 signaling pathway and inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome [J]. Exp Ther Med，2022，23（4）：300.
[103]Liang SL，Yang ZJ，Hua L，et al. Ciclopirox inhibits NLRP3 inflammasome activation via protecting mitochondria and ameliorates imiquimod-induced psoriatic inflammation in mice [J]. Eur J Pharmacol，2022，930：175156.
[104]Chen YH，Chen XH，Liang SL，et al. Chlorquinaldol inhibits the activation of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 inflammasome and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice [J]. Chem Biol Interact，2022，365：110122.
[105]Hu JJ，Liu X，Xia SY，et al. FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation [J]. Nat Immunol，2020，21（7）：736-745.
[106]Poff AM，Ari C，Arnold P，et al. Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer [J]. Int J Cancer，2014，135（7）：1711-1720.
[107]Youm YH，Nguyen KY，Grant RW，et al. The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease [J]. Nat Med，2015，21（3）：263-269.
[108]Kamal MM，Akter S，Lin CN，et al. Sulforaphane as an anticancer molecule：mechanisms of action，synergistic effects，enhancement of drug safety，and delivery systems [J]. Arch Pharm Res，2020，43（4）：371-384.
[109]Royston KJ，Paul B，Nozell S，et al. Withaferin A and sulforaphane regulate breast cancer cell cycle progression through epigenetic mechanisms [J]. Exp Cell Res，2018，368（1）：67-74.

（收稿日期：2022-09-05；修回日期：2022-11-20）

药物分析与检验

一测多评法同时测定新敷愈散中 6 种成分含量

黄学娣[1]，唐莉华[1]，施林峰[2]，傅宏辉[2]，唐怡[1]，蒋司晨[1]，李凡[1]，熊跃[1]，叶喜德[2*]（1. 江西省中西医结合医院，南昌　330003；2. 江西中医药大学药学院，南昌　330004）

摘要：目的　建立一测多评法同时测定新敷愈散中大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸的含量。**方法**　运用 HPLC 法，以 Diamonsil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱，以乙腈 -0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱，柱温 30 ℃，检测波长 230 nm，流速 1.0 mL•min^{-1}，进样量 10 μL；以盐酸小檗碱为内标物，建立盐酸小檗碱与其他 5 种成分的相对校正因子，并计算各成分含量。**结果**　大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸分别在 6.72 ～ 33.60、10.80 ～ 54.00、4.97 ～ 24.87、8.76 ～ 43.80、4.40 ～ 22.00、10.49 ～ 52.48 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好；平均加样回收率为 98.00% ～ 104.79%，*RSD* 值均小于 3.0%；大黄素、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸相对校正因子分别为 1.158、6.172、1.633、3.746、3.134；一测多评法计算值与 ESM 实测值间差异无统计学意义（$P > 0.05$）。**结论**　建立的一测多评法科学合理、稳定可行，可用于测定新敷愈散中 6 种成分含量，也为深入开展该制剂质量标准研究提供科学依据。

关键词：新敷愈散；一测多评法；大黄素；绿原酸
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1907-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.034

Simultaneous determination of 6 components in Xinfuyu powder by QAMS

HUANG Xue-di[1], TANG Li-hua[1], SHI Lin-feng[2], FU Hong-hui[2], TANG Yi[1], JIANG Si-chen[1], LI Fan[1], XIONG Yue[1], YE Xi-de[2*] (1. *Jiangxi Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, *Nanchang* 330003; 2. *College of Pharmacy*, *Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective　To simultaneously determine emodin, berberine hydrochloride, phellodendrine hydrochloride, atractylodin, rutin and chlorogenic acid in Xinfuyu powder. **Methods**　HPLC method were used performed on Diamonsil C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The chromatographic column is gradient elution acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution was used as the mobile phase, and the column temperature was 30 ℃ . The detection wavelength was 230 nm and the flow rate was 1 mL • min^{-1}. While the injection volume was 10 μL with berberine hydrochloride as the internal standard. The relative correction factors of the 6 components were established, and the content of each component was calculated. **Results**　The linearity of emodin, berberine hydrochloride, phellodendrine hydrochloride, atractylodin, rutin and chlorogenic acid showed good linearity at 6.72 ～ 33.60, and 10.80 ～ 54.00, 4.97 ～ 24.87, 8.76 ～ 43.80, 4.40 ～ 22.00, and 10.49 ～ 52.48 μg • mL^{-1}. The average sample recovery range was 98.00% ～ 104.79%, with the *RSD* ＜ 3.0%. The relative correction factors of emodin, phellodendrine hydrochloride, atractylodin, rutin and chlorogenic acid were 1.158, 6.172, 1.633, 3.746 and 3.134 respectively. There was no significant difference between the calculated values by QAMS method and the measured values by ESM ($P > 0.05$). **Conclusion** The method is stable, reasonable, and feasible, which can be used to determine the content of 6

基金项目：江西省卫生健康委科技计划项目（No.202211485）；江西省中医药管理局重点研究室、临床研究基地项目（No.KP202102010）。
作者简介：黄学娣，女，主管药师，主要从事医院制剂和临床药学研究，email：110113301@qq.com　*通信作者：叶喜德，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药学研究，email：552376722@qq.com

components in Xinfuyu powder and provide reference for further quality control.

Key words: Xinfuyu powder; quantitative analysis of multi-components with a single marker; emodin; chlorogenic acid

特异性皮炎有慢性、炎症性而呈反复发作等特点，为一种遗传性皮肤病[1]，好发于婴幼儿，易受环境污染、不良生活习性、社会压力等因素的影响，其发病率高，并呈逐年增加之势[2]。中医将特异性皮炎称作为“四弯风病”，其发病机制常被认为是胎毒内蕴，邪火扰心[3]；发病之本在于脾虚[4]，脾胃虚弱，失于健运，致气血生化不足，肌肤失养所致。新敷愈散为江西中西医结合医院临床 20 多年的经验方，对四弯风病具显著疗效。该方是由苍术、大黄、百部、黄柏、苦参、蛇床子、地肤子、防风、艾叶等 9 味药组成，具清热利湿、祛风止痒之功。方中大黄、黄柏清热解毒，泻火消肿[5]，所含大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱等为其主要活性成分。苍术燥湿健脾，祛风散寒[6]，苍术素为其主要活性成分。此外，方中药材所含芦丁和绿原酸等具抗炎、抗菌之效，在新敷愈散中发挥着关键作用[7-8]。

中药复方所含成分较多，采用单一成分难于评价其整体质量。而一测多评法，可把君药主要有效成分设为内标，并与其他成分之间设相对校正因子，以计算其他成分含量[9]，从而解决单一成分难于控制中药复方质量问题[10-11]。基于此，本研究拟建立新敷愈散中主要有效活性成分大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸一测多评方法，以评价该复方质量。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1100、1260 型高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司），FA1004N 十万分之一电子分析天平（上饶市鸿翔实业有限公司），电子天平（上海衡平仪器仪表厂），万分之一电子天平（郑州南北仪器设备有限公司），KQ-500E 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），旋转蒸发仪（厦门精艺兴业科技有限公司），循环真空泵（巩义市予华仪器有限责任公司），TDL-80-2C 低速离心机（上海安亭科学仪器厂）。

1.2 试药

盐酸小檗碱、大黄素（成都曼思特生物科技有限公司，批号分别为 MUST-20073011、MUST-18110810，纯度均大于 98%）；盐酸黄柏碱、绿原酸（四川省维克奇生物科技有限公司，批号分别为 wkq21031209、wkp22032106，纯度 ≥ 98%）；芦丁、苍术素（成都克洛玛生物有限公司，批号分别为 CHB201103、CHB201123，纯度 ≥ 98%）；甲醇、乙腈（色谱级，安徽天地高纯溶剂有限公司）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司），其他试剂均为分析纯。本研究所用药材均由江西中医药大学中药鉴定教研室刘应蛟副教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea*（Thunb.）DC. 的干燥根茎；蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎；百部科植物直立百部 *Stemona sessilifolia*（Miq.）Miq. 的干燥块根；芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮；豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根；伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri*（L.）Cuss. 的干燥成熟果实；藜科植物地肤 *Kochia scoparia*（L.）Schrad. 的干燥成熟果实；伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata*（Turcz.）Schischk. 的干燥根；菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl.et Vant. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Diamonsil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，10% ～ 13%A；5 ～ 10 min，13% ～ 17%A；10 ～ 20 min，17% ～ 25%A；20 ～ 30 min，25% ～ 60%A；30 ～ 40 min，60% ～ 70%A；40 ～ 45 min，70% ～ 80%A；45 ～ 50 min，80% ～ 100%A）；柱温 30 ℃；进样量 10 μL；流速 1.0 mL·min^{-1}。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别精密称取大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸对照品 1.68、2.70、1.35、2.19、1.10、2.64 mg，置 10 mL 的量瓶，甲醇稀释至刻度得到质量浓度分别为 0.168、0.270、0.135、0.219、0.110、0.264 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，待测。

2.2.2 供试品溶液制备 按照处方配伍比例（各药材比均为 1∶1），分别称取处方中 30 g 药材并粉碎过筛。准确称取 1.0 g 各药材粉末，一并放入锥形瓶中，加入甲醇 25 mL，微波超声提取 30 min，

过滤滤渣，离心（3500 r·min^{-1}，10 min），轻取上清液；连续提取两次，合并提取液，取合并后的上清液，用 0.22 μm 滤膜过滤，即得。

2.3　*方法学考察*

2.3.1　系统适用性试验　精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液，进样测定，得到色谱图，见图 1。由图 1 可知，大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱等 6 种对照品分离效果较好，样品中色谱峰与对照品保留时间相同。

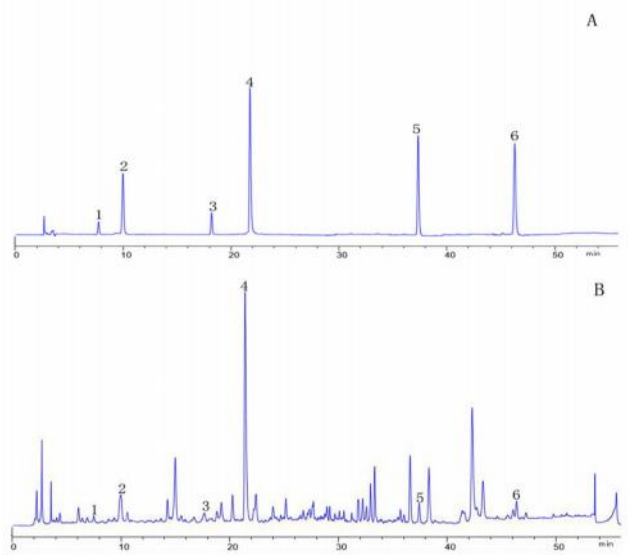


图 1　混合对照品（A）和供试品溶液（B）的高效液相色谱图

Fig 1　HPLC of the mixed control（A）and the test solution（B）

1. 盐酸黄柏碱（phellodendrine hydrochloride）；2. 绿原酸（chlorogenic acid）；3. 芦丁（rutin）；4. 盐酸小檗碱（berberine hydrochloride）；5. 大黄素（rhein）；6. 苍术素（atractylodin）

2.3.2　线性关系考察　分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL 混合对照品溶液，置 10 mL 量瓶中，依次用甲醇稀释至刻度，进样测定。以对照品的峰面积为 y 轴，质量浓度为 x 轴。绘制标准曲线，结果见表 1。

表 1　各成分线性关系

Tab 1　Linearity of various constituents

成分	回归方程	R^2	范围 /（μg·mL^{-1}）
大黄素	$y = 3.18\times10^4x - 9.93$	0.9997	6.72 ～ 47.04
盐酸小檗碱	$y = 3.74\times10^4x - 59.83$	0.9997	10.80 ～ 75.60
盐酸黄柏碱	$y = 5.92\times10^3x - 1.43$	0.9997	4.97 ～ 34.83
绿原酸	$y = 1.22\times10^4x - 22.22$	0.9995	10.49 ～ 73.43
苍术素	$y = 2.63\times10^4x - 55.99$	0.9999	8.76 ～ 61.32
芦丁	$y = 9.70\times10^3x - 2.72$	0.9996	4.40 ～ 30.80

2.3.3　精密度试验　精确吸取相同的混合对照品溶液，连续进样 6 次测定，记录峰面积，结果大黄素、盐酸黄柏碱、苍术素、盐酸小檗碱、芦丁和绿原酸峰面积的 *RSD* 值分别为 0.68%、0.71%、0.70%、0.76%、1.3%、1.3%，表明该方法精密度良好。

2.3.4　稳定性试验　混合对照品溶液在 0、2、4、8、12 和 24 h 进样测定，结果大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁、绿原酸峰面积的 *RSD* 值分别为 1.9%、1.3%、2.3%、2.1%、0.93%、1.2%，表明该方法稳定性良好。

2.3.5　重复性试验　精密称取同一批药材 1.0 g，制备 6 份样品，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸含量的 *RSD* 分别为 0.98%、1.2%、1.4%、2.2%、3.0% 和 1.7%，表明该方法具有良好的重复性。

2.3.6　加样回收试验　精密吸取已知含量的样品 6 份，分别置锥形瓶中，再精密加入适量的对照品，照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次进行含量测定，得大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸的加样回收率分别为 104.14%、102.29%、104.79%、99.76%、101.95%、98.00%，*RSD* 值均小于 3%，表明该方法准确度较好。

2.4　*相对校正因子计算*

吸取混合对照品溶液进样测定。以盐酸小柏碱为内标，按照公式：$f_{si} = f_s/f_i = (m_i\times A_s)/(m_s\times A_i)$ [其中 A_s 为盐酸小檗碱内标物的峰面积，m_i 为盐酸黄柏碱内标物的浓度，A_i 是被测指标成分的峰面积，m_s 为被测指标成分的浓度] 计算各成分相对校正因子，结果见表 2。

表 2　各成分相对校正因子

Tab 2　Relative correction factors of various components

序号	相对校正因子				
	盐酸黄柏碱	绿原酸	芦丁	大黄素	苍术素
1	6.286	3.050	3.792	1.173	1.635
2	6.093	3.180	3.603	1.165	1.609
3	6.158	3.242	3.774	1.154	1.623
4	6.169	3.116	3.787	1.140	1.694
5	6.156	3.082	3.775	1.156	1.605
平均值	6.172	3.134	3.746	1.158	1.633
RSD/%	1.1	2.5	2.1	1.1	2.2

2.4.1　不同仪器和色谱柱的考察　精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液，分别考察不同型号的高效液相色谱仪（Agilent1100、Agilent1260）及不同色谱柱 [Diamonsil C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）、Tnature C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Diamonsil C_{18}（2）（200 mm×4.6 mm，5 μm）] 对校正因子的影响，结果见表 3。

2.4.2　不同柱温的考察　精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液，进样测定，柱温分别设置为 25、30、35 ℃，以考察盐酸小檗碱为内标物时盐酸黄檗碱、绿原酸、芦丁、大黄素、苍术素等相对

表 3 不同仪器、色谱柱对相对校正因子的影响

Tab 3 Effect of different instruments and columns on relative correction factors

仪器	色谱柱	相对校正因子				
		盐酸黄柏碱	绿原酸	芦丁	大黄素	苍术素
Agilent1100	Diamonsil C_{18}	6.156	3.082	3.752	1.160	1.678
	Tnature C_{18}	6.046	3.027	3.775	1.144	1.605
	Diamonsil C_{18}（2）	6.119	3.022	3.774	1.127	1.640
Agilent1260	Diamonsil C_{18}	6.106	2.954	3.772	1.116	1.697
	Tnature C_{18}	6.179	2.967	3.770	1.125	1.614
	Diamonsil C_{18}（2）	6.089	2.983	3.771	1.112	1.696
平均值		6.116	3.006	3.769	1.131	1.655
RSD/%		0.78	1.6	0.23	1.6	2.5

校正因子。结果相对校正因子 *RSD* 依次为 1.1%、1.4%、1.8%、2.7%、2.4%，*RSD* 值 均 ＜ 3.0%，表明柱温对各成分相对校正因子的影响较小。

2.4.3 待测成分色谱峰的定位 相对保留时间是确定待测成分色谱峰的主要有效方法 [12-13]。本研究以盐酸小檗碱为内标物，在同一条件下分别考察其他 5 个成分在 Agilent1100、1260 型高效液相色谱系统，Diamonsil C_{18}、Tnature C_{18}、Diamonsil C_{18}（2）等 3 种色谱柱下的相对保留时间，结果见表 4，*RSD* 值均＜ 2.0%，表明各检测成分相对保留时间波动较小。

表 4 不同色谱系统、色谱柱下各成分的相对保留时间

Tab 4 Effect of different instruments and columns on the relative retention time

仪器	色谱柱	盐酸黄柏碱	绿原酸	芦丁	大黄素	苍术素
Agilent1100	Diamonsil C_{18}	0.358	0.455	0.834	1.738	1.910
	Tnature C_{18}	0.354	0.462	0.839	1.735	1.915
	Diamonsil C_{18}（2）	0.354	0.460	0.837	1.719	1.914
Agilent1260	Diamonsil C_{18}	0.366	0.459	0.831	1.689	1.922
	Tnature C_{18}	0.367	0.468	0.840	1.690	1.924
	Diamonsil C_{18}（2）	0.367	0.473	0.846	1.693	1.927
平均值		0.361	0.463	0.838	1.711	1.919
RSD/%		1.8	1.4	0.62	1.34	0.35

2.4.4 QAMS 法与外标法测定结果的比较 精密吸取 6 份供试品溶液，进样检测，结果采用内标法（QAMS）和外标法（ESM）计算含量，并进行配对 *t* 检验 [14]。结果表明，两种方法所得含量之间的差异无统计学意义，见表 5。

表 5 各成分含量测定结果 (mg・g^{-1})

Tab 5 Content determination of each component (mg・g^{-1})

序号	盐酸小檗碱（ESM）	盐酸黄柏碱		绿原酸		芦丁		大黄素		苍术素	
		ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
1	3.313	0.594	0.582	2.001	1.999	0.792	0.772	0.311	0.303	0.392	0.393
2	3.400	0.566	0.554	2.050	2.048	0.782	0.762	0.325	0.317	0.407	0.407
3	3.435	0.564	0.552	2.068	2.067	0.799	0.778	0.324	0.316	0.408	0.408
4	3.428	0.584	0.571	2.036	2.035	0.786	0.765	0.328	0.32	0.410	0.410
5	3.425	0.591	0.578	2.048	2.047	0.782	0.762	0.321	0.313	0.405	0.405
6	3.400	0.570	0.558	2.057	2.055	0.877	0.855	0.326	0.329	0.412	0.412
P		0.132		0.914		0.350		0.180		0.967	

3 讨论

四弯风病出《医宗金鉴》卷七十一，西医又称异位性皮炎，是指肘、膝关节曲侧窝之湿疮 [15]。多因禀赋不耐，湿热内蕴，风湿热邪客于肌肤，经络受阻所致。新敷愈散为针对该病治疗的一首临床经验方，具有良好的临床疗效。本研究以处方中君药主要有效活性成分大黄素、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苍术素、芦丁和绿原酸等作为质量评价指标，通过建立一测多评法，以开展新敷愈散质量标准研究，以提高制剂质量，确保临床安全用药。

在预试验阶段，先对所选择的各指标成分色谱条件进行优化。在研究过程中，对不同提取方式（超声提取、回流提取）、不同提取溶剂（60% 甲醇、80% 甲醇、甲醇）、不同提取时间（15、30、45 min）等因素进行了考察，发现采用甲醇超声 30 min 后，各指标成分的峰形最好、含量最高。根据基线稳定性、峰高、峰形，结合去除干扰峰的影响，将紫外检测波长设置为 230 nm。对于内标物，在新敷愈散中，依照组方中各药材所起的作用，并参照一测多评法建立的技术指南 [17]，考虑获得难易程度及经济、化学性质稳定等因素，选择处方中含量较大且生理活性较强的盐酸小檗碱为内标物。该成分是处方中黄柏主要有效成分之一，具有性质稳定、含量高、易获得和价格低廉等优点，在检测过程中，发现其峰形高且未见干扰峰，保留时间适中，符合内标物标准。

分别采用 QAMS 法与 ESM 法测定新敷愈散中 6 种成分，两种方法计算值差异无统计学意义，说明该法准确、高效、科学，成本低廉，而且更符合中药现代化质量控制的时代发展要求，为进一步研究新敷愈散质量控制和效果评价奠定了基础，为临床合理用药提供了质量保障。

参考文献

[1] 白彦萍，刘文静 . 特应性皮炎的中医辨证与治疗 [J]. 中国医学文摘（皮肤科学），2016，33（2）：215-217，93.

[2] 王茸慧，李云飞，王丽云，等 . 特应性皮炎中医非药物疗法临床研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志，2023，30（4）：176-180.

[3] 王雄，郎娜，付中学 . 黄尧洲教授从心论治特应性皮炎经验介绍 [J]. 世界中西医结合杂志，2017，12（1）：40-42，80.

[4] 蔡静，杨志波 . 杨志波治疗特应性皮炎经验 [J]. 湖南中医杂志，2018，34（4）：46-48.

[5] 许永泽，许菊珍 . 不同赋形剂调制大黄黄柏散外敷治疗急性胆囊炎的临床观察 [J]. 中国中医药科技，2016，23（4）：481-482.

[6] 杨阳，赵容，刘畅，等 . 苍术与白术的本草考证 [J]. 中医药信息，2023，1：1-5.

[7] 兰晓燕，朱龙波，黄显章，等 . 艾叶中主要化学成分的鉴定及其含量测定研究 [J]. 中草药，2021，52（24）：7630-7637.

[8] 李兰柱，胡红莲，管晓轩，等 . 芦丁的生物活性及其在动物生产中的应用研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学，2022，43（5）：68-73，86.

[9] 闫艳，杜晨晖 . 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2022，24（26）：2378-2387.

[10] Su CN，Li CH，Sun K，et al. Quantitative analysis of bioactive components in walnut leaves by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with QAMS [J]. Food Chem，2020，331：127180.

[11] Stavrianidi A，Stekolshchikova E，Porotova A，et al. Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products [J]. J Pharm Biomed Anal，2017，132：87-92.

[12] 左雅敏，李琛，彭兴春，等 . HPLC- 一测多评法测定黄精及其饮片中 6 种成分的含量 [J]. 中国药房，2019，30（13）：1748-1754.

[13] 梁欣雨，周晓钢，何兵，等 . 一测多评法同时测定小儿金翘颗粒中 7 种成分的含量 [J]. 中国药房，2020，31（10）：1179-1184.

[14] 陈江平，余欣彤，黎桃敏，等 . 一测多评法同时测定白芷配方颗粒中 6 种成分的含量 [J]. 中南药学，2022，20（11）：2626-2630.

[15] 施建新，李红敏，吴淞，等 . 吴淞治疗儿童特应性皮炎经验 [J]. 陕西中医，2022，43（11）：1609-1612.

[16] 蒋丽红 . 龙牡汤治疗青年特应性皮炎的临床疗效及其对患者生活质量的影响 [J]. 临床合理用药杂志，2019，12（18）：16-17.

[17] 王智民，钱忠直，张启伟，等 . 一测多评法建立的技术指南 [A]// 中国中医科学院首席研究员学术论文集萃 [C]. 中国中医药信息研究会，2012.

（收稿日期：2023-04-10；修回日期：2023-05-17）

HPLC-DAD 法检测降糖类保健食品中非法添加的二肽基肽酶 -4 抑制剂和钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂

徐硕，徐文峰，邝咏梅，金鹏飞*（北京医院药学部，国家老年医学中心，中国医学科学院老年医学研究院，北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室（北京医院），北京　100730）

摘要：目的　利用高效液相色谱 - 二极管阵列检测器（HPLC-DAD）技术，建立降糖类保健食品中可能添加的维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净、卡格列净和西格列汀等 8 种化学药物的检查方法。**方法**　采用 Agilent Zorbax C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈 -0.01 mol·L^{-1} 磷酸二氢铵水溶液（含 0.04% 辛烷磺酸钠，用磷酸调 pH 至 3.3）为流动相，进行梯度或等度洗脱，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 25 ℃，检测波长为 210、220 nm。**结果**　8 种化学成分在对应质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系（$r \geq 0.9999$）；低、中、高 3 个质量浓度的平均回收率均在 98.8% ～ 100.7%，*RSD* 在 0.44% ～ 0.76%；精密度和稳定性良好，*RSD* 均小于 1.0%；检测限为 0.022 ～ 0.54 μg·mL^{-1}；定量限为 0.070 ～ 1.7 μg·mL^{-1}。**结论**　该方法简便、准确、易于推广，适用于降糖类保健食品中 8 种可能非法添加的新型降糖化学药物的检测。

关键词：高效液相色谱 - 二极管阵列检测器；保健食品；非法添加；二肽基肽酶 -4（DPP-4）抑制剂；钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2（SGLT2）抑制剂

中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1911-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.035

作者简介：徐硕，女，副主任药师，主要从事药物分析研究，email：jessica06250917@126.com　*通信作者：金鹏飞，男，主任药师，主要从事药物分析及医院药学研究，email：j790101@163.com

Determination of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and sodium glucose cotransporter 2 inhibitor illegally added in antidiabetic dietary supplements by HPLC-DAD

XU Shuo, XU Wen-feng, KUANG Yong-mei, JIN Peng-fei* (*Department of Pharmaceutical Science, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drugs Risk and Individual Application (Beijing Hospital), Beijing* 100730)

Abstract: Objective To determine the 8 chemical drugs (vildagliptin, saxagliptin, alogliptin, linagliptin, empagliflozin, dapagliflozin, canagliflozin and sitagliptin) illegally added to antidiabetic dietary supplements by high performance liquid chromatography (HPLC) method with diode array detector (DAD). **Methods** An Agilent Zorbax C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for the separation, with gradient elution or isocratic elution of acetonitrile and aqueous solution of ammonium dihydrogen phosphate (containing 0.04% sodium octane sulfonate and adjusting pH to 3.3 with phosphoric acid) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 25 ℃ , and the detection wavelength was set at 210 and 220 nm. **Results** Totally 8 chemical constituents showed good linearity between certain mass concentration ranges and the peak area ($r \geqslant 0.9999$). The average spiked recoveries of the low, middle and high levels ranged 98.8% ～ 100.7% ($n = 9$), and the relative standard deviations (*RSD*s) ranged 0.44% ～ 0.76%. The precisions and stabilities were satisfactory with both *RSD*s less than 1.0%. Limit of detection and limit of quantity were 0.022 ～ 0.54 μg • mL^{-1} and 0.070 ～ 1.7 μg • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and feasible in the detection of 8 new hypoglycemic chemical drugs illegally added in antidiabetic dietary supplements.

Key words: high performance liquid chromatography-diode array detector; dietary supplement; illegal addition; dipeptidyl peptidase-4 inhibitor; sodium glucose cotransporter 2 inhibitor

保健食品因其具有保健功能或者能补充维生素、矿物质等营养物质，正在逐步被广大群众所接受。为谋取暴利，一些不法分子在保健食品中添加化学药物。因添加西药成分的种类和含量具有不确定性，消费者服用之后会引发不良反应[1-2]。保健品食品中非法添加化学药物的筛查方法包括近红外光谱（NIR）法、薄层色谱（TLC）法、高效液相色谱（HPLC）法、液相色谱 - 质谱联用（LC-MS）法、高效毛细管电泳（HPCE）法、离子迁移谱（IMS）法、胶体金免疫层析法（ICA）等[3-6]，每种检测技术有其各自的优势和缺点。目前应用较多的主要为 HPLC 法[1，7-11]和 LC-MS 法[12-15]，其中 HPLC 技术以其操作简便、具备良好的分离能力、分析速度快及可准确定量等优点，被广泛使用[16]。二极管阵列检测器（DAD）作为 HPLC 法最常用的检测器，其特点是能进行不同波长切换，同一色谱法同时分析多种成分，选择待测成分的最大吸收波长，从而获得较高的灵敏度和较低的检测限。对于不能实现基线分离且紫外吸收曲线差异较大的物质，可以在不改变色谱条件下排除杂质的干扰，并且能够鉴定色谱峰的纯度[17]。

二肽基肽酶 -4（DPP-4）抑制剂作为一类新型口服降糖药物，可以使患者血糖水平得到明显控制，既可以改善胰岛素抵抗，还兼具保护心血管和肾脏功能的作用，能使糖尿病肾病的发生及发展得到延缓[18-19]。传统降糖药物会导致胰岛细胞的功能产生不可逆损害，进而使患者血糖水平难以控制，而 DPP-4 抑制剂能够保护胰岛细胞，并且引起低血糖的风险较低[19-20]。已在我国批准上市的 DPP-4 抑制剂有西格列汀、维格列汀、沙格列汀、利格列汀和阿格列汀[21]。钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2（SGLT2）抑制剂也是近年来开发的用于 2 型糖尿病的新型降糖药物，能使肾重吸收葡萄糖减少，尿糖排出增加，从而降低血糖[22]。在我国批准上市的 SGLT2 抑制剂包括恩格列净、达

格列净和卡格列净，该类药物主要通过增加尿液葡萄糖的排泄降低血糖[23-24]。糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症之一，SGLT2 抑制剂作为糖尿病治疗的新靶点，具有保护肾脏的优势[23]。

目前检测具有辅助降糖作用保健食品中非法添加西药成分的研究中，主要是对磺脲类和非磺脲类胰岛素促泌剂、双胍类、α-葡萄糖苷酶抑制剂、胰岛素增敏剂等几类药物进行筛查[25]。近年来非法添加化学药物的隐蔽性日益增加，一些新型口服降糖药物也有可能被添加，这些药物须在医师或药师指导下应用，否则极易出现不良反应。例如 SGLT2 抑制剂类药物报道的不良反应主要为尿路感染和生殖系统感染[26]，还可能诱发低血压、低血糖、鼻咽炎[22]。本实验室前期建立了检测中成药和保健食品中可能非法添加的格列喹酮、那格列奈、盐酸二甲双胍等 14 种化学药物的 HPLC 方法[27]，该方法中未包括对 DPP-4 抑制剂和 SGLT2 抑制剂的检测，而目前文献对于该类药物的非法添加筛查尚未见报道。本研究通过 HPLC-DAD 技术，建立了检测具有辅助降糖作用保健食品中可能添加的维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净、卡格列净和西格列汀等 8 种化学成分的方法，可作为非法添加降糖药物检测方法的补充。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪（配备有 G1311C 四元梯度泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、DAD 检测器、LC OpenLAB 色谱工作站，美国 Agilent Technologies 有限公司）；XP-205 型电子天平（精度为十万分之一，瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司）；KQ-300DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2　试药

对照品：阿格列汀（批号：E15N11K130910，纯度：98%）、达格列净（批号：E20J10K90919，纯度：98%）、卡格列净（批号：E1958K44111，纯度：99%）（上海源叶生物科技有限公司）；沙格列汀（批号：7J32972，纯度：94.3%，美国阿斯利康制药有限公司）；西格列汀（批号：FCB081315，纯度：100%，英国 Fluorochem 有限公司）；维格列汀（批号：52-GHZ-31-1，纯度：97%）、利格列汀（批号：1-HMT-123-1，纯度：98%）、恩格列净（批号：1-PQY-173-1，纯度：98%）[加拿大 Toronto Research Chemicals（TRC）公司]。实验样品：具有降糖作用的保健食品 6 批，均为胶囊剂（均为市场购买）。乙腈、磷酸为色谱纯 [批号分别为 204129、158625，Thermo Fisher Scientific（中国）有限公司]；磷酸二氢铵（分析纯，批号：20190318）、甲醇（分析纯，批号：20210122）、辛烷磺酸钠（分析纯，批号：20190826）（国药集团化学试剂有限公司）；实验用水为二级实验用水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

2.1.1　色谱条件Ⅰ　色谱柱为 Agilent Zorbax C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.01 mol•L^{-1} 磷酸二氢铵水溶液（含 0.04% 辛烷磺酸钠，用磷酸调 pH 至 3.3）（B），梯度洗脱：0 ～ 12 min，10% ～ 35%A；12 ～ 25 min，35% ～ 40%A；25 ～ 45 min，40% ～ 70%A。流速为 1.0 mL • min^{-1}；检测波长为 220 nm；柱温为 25 ℃；进样体积为 10 μL。该条件用于维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净和卡格列净的检测。

2.1.2　色谱条件Ⅱ　色谱柱为 Agilent Zorbax C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈 -0.01 mol • L^{-1} 磷酸二氢铵水溶液（含 0.04% 辛烷磺酸钠，用磷酸调 pH 至 3.3）（30∶70）；流速为 1.0 mL • min^{-1}；检测波长为 210 nm；柱温为 25 ℃；进样体积为 10 μL。该条件用于西格列汀的检测。

2.2　溶液的制备

2.2.1　对照品溶液的制备　① 混合对照品储备液Ⅰ：精密称定各对照品适量，加入适量甲醇，超声使其溶解，即得维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净和卡格列净分别为 4932、668.2、570.4、546.8、595.8、494.9 和 522.7 μg • mL^{-1} 的混合对照品储备液。② 混合对照品溶液Ⅰ：分别精密量取混合对照品储备液Ⅰ2、2.5、5、10、20、40、50 mL 置于 100 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得系列浓度的混合对照品溶液，以中间浓度的混合对照品溶液（维格列汀：493.2 μg • mL^{-1}，沙格列汀：66.82 μg • mL^{-1}，阿格列汀：57.04 μg • mL^{-1}，利格列汀：54.68 μg • mL^{-1}，恩格列净：59.58 μg • mL^{-1}，达格列净：49.49 μg • mL^{-1}，卡格列净：52.27 μg • mL^{-1}）作为混合对照品溶液Ⅰ。③ 对照品储备液Ⅱ：取西格列汀对照品适量，精密称定，加入甲醇超声使溶解，即得质量浓度为 1134 μg • mL^{-1} 的对照品储备液Ⅱ。④

对照品溶液Ⅱ：分别精密量取对照品储备液Ⅱ2、2.5、5、10、20、40、50 mL，置于 100 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得系列浓度的对照品溶液，以中间浓度的溶液（西格列汀 113.4 μg·mL^{-1}）为对照品溶液Ⅱ。分别精密吸取混合对照品溶液Ⅰ、对照品溶液Ⅱ10 μL，进样分析，用于方法的系统适用性研究和实际样品的筛查。

2.2.2 供试品溶液的制备 取相当于 1 次服用量的样品，将其内容物置于乳钵中研细，并剪碎胶囊壳，将两者混合均匀，精密称定内容物和胶囊壳混合物适量，放于 50 mL 量瓶中，加入甲醇 30 mL，超声提取（功率：350 W，频率：40 kHz）30 min，取出，样品温度降至室温后，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。进样前用 0.22 μm 孔径尼龙滤膜过滤。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 阴性样品为某品牌胶囊剂，在“2.1”项色谱条件下检测不含有上述 8 种化学成分，取该样品适量，精密称定，按照“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液Ⅰ、对照品溶液Ⅱ和阴性样品溶液，分别利用“2.1”项下色谱条件Ⅰ、Ⅱ进样分析，结果表明维格列汀等 8 个待筛查成分的检测不会受到阴性样品中其他成分以及辅料的干扰，见图 1。8 个化学成分的 DAD 扫描叠加图见图 2。

2.4 系统适用性、线性关系、检测限和定量限

取混合对照品溶液Ⅰ在“2.1.1”项下色谱条件进样测定，结果显示其理论塔板数均在 99 000 以上，色谱图中相邻色谱峰之间分离度大于 1.5。取对照品溶液Ⅱ在“2.1.2”项下色谱条件进样测定，结果西格列汀的理论塔板数大于 12 000。精密吸取“2.2.1”项下的系列混合对照品溶液Ⅰ和西格列汀对照品溶液（对照品溶液Ⅱ）进样测定，以各成分的质量浓度（μg·mL^{-1}，*X*）对峰面积（*Y*）进行线性回归。以信噪比（*S/N*）约为 3.0 时的浓度为各成分的检测限（LOD），*S/N* 约为 10.0 时的浓度为定量限（LOQ）。结果见表 1。

2.5 精密度试验

精密吸取同一回收率试验样品供试品溶液（其中维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净和卡格列净的质量浓度分别为 493.2、66.82、57.04、54.68、59.58、49.49 和 52.27 μg·mL^{-1}；西格列汀的质量浓度为 113.4 μg·mL^{-1}），连续进样测定 6 次，记录峰面积，

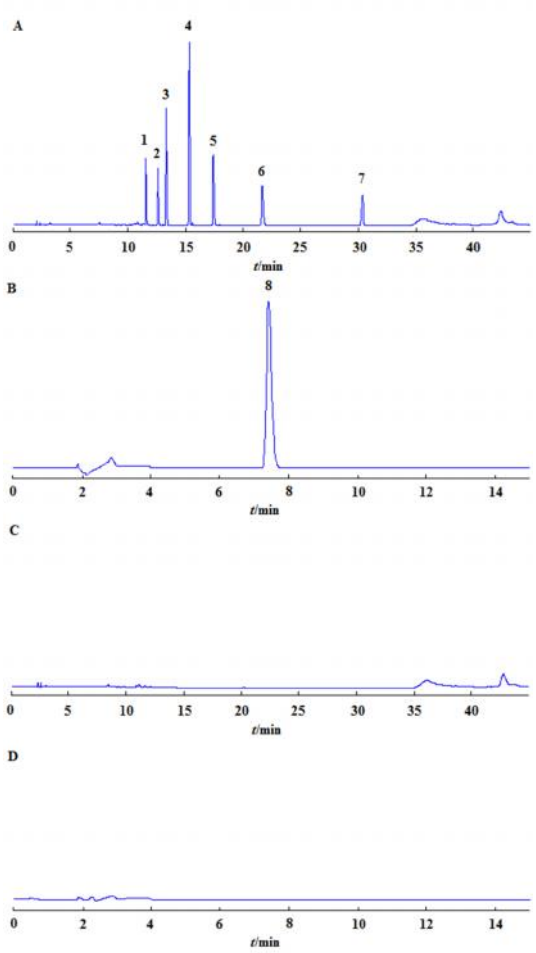


图 1 混合对照品溶液Ⅰ（A）、对照品溶液Ⅱ（B）、阴性样品溶液Ⅰ（C）和阴性样品溶液Ⅱ（D）的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference solution Ⅰ（A），reference solution Ⅱ（B），negative sample solution Ⅰ（C）and negative sample solution Ⅱ（D）

1. 维格列汀（vildagliptin）；2. 沙格列汀（saxagliptin）；3. 阿格列汀（alogliptin）；4. 利格列汀（linagliptin）；5. 恩格列净（empagliflozin）；6. 达格列净（dapagliflozin）；7. 卡格列净（canagliflozin）；8. 西格列汀（sitagliptin）

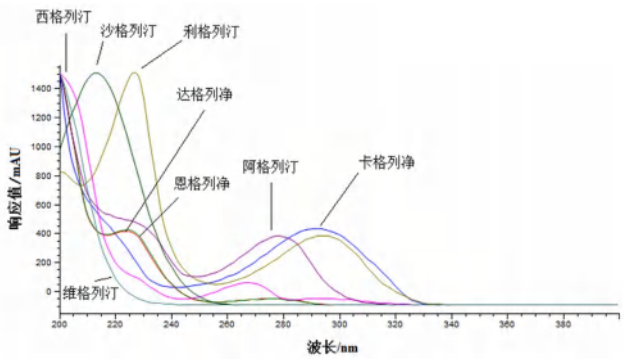


图 2 8 个化学成分的 DAD 扫描叠加图

Fig 2 DAD scanning overlay of 8 chemical components

结果维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净、卡格列净和西格列汀峰面积的 *RSD* 分别为 0.41%、0.26%、0.34%、0.39%、

表 1　8 个成分的线性关系和范围、检测限和定量限

Tab 1　Linearity and range，LODs and LOQs of 8 chemical components

化学成分	回归方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	LOD/（μg • mL^{-1}）	LOQ/（μg • mL^{-1}）
维格列汀	$Y = 2.029X + 19.95$	1.000	98.64 ～ 2466	0.54	1.7
沙格列汀	$Y = 11.60X + 0.0999$	1.000	13.36 ～ 334.1	0.089	0.28
阿格列汀	$Y = 27.86X + 6.690$	1.000	11.41 ～ 285.2	0.039	0.12
利格列汀	$Y = 47.91X + 49.33$	1.000	10.94 ～ 273.4	0.022	0.070
恩格列净	$Y = 25.81X + 2.1115$	1.000	11.92 ～ 297.9	0.062	0.19
达格列净	$Y = 24.55X + 5.314$	1.000	9.898 ～ 247.5	0.089	0.29
卡格列净	$Y = 18.29X + 17.18$	1.000	10.45 ～ 261.4	0.12	0.40
西格列汀	$Y = 18.15X + 20.54$	0.9999	22.68 ～ 567.0	0.061	0.20

0.29%、0.36%、0.39% 和 0.13%，说明仪器精密度良好。

2.6　重复性试验

取某品牌保健食品胶囊剂（阴性样品，经检测不含有上述 8 个化学成分），精密称取 6 份，每份称取约 2 粒内容物的量，置于 50 mL 量瓶中，向其中分别精密加入混合储备液Ⅰ（其中维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净和卡格列净的质量浓度分别为 4995、527.8、533.6、551.3、521.9、539.7 和 559.2 μg • mL^{-1}）或对照品储备液Ⅱ（西格列汀的质量浓度为 1065 μg • mL^{-1}）5 mL，按照“2.2.2”项下方法制备后进样测定。结果维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净、卡格列净和西格列汀的平均含量分别为 12.52、1.31、1.34、1.40、1.30、1.35、1.42 和 2.64 mg/ 粒，*RSD* 均小于 2%，说明方法的重复性良好。

2.7　回收试验

取某品牌保健食品胶囊剂（阴性样品，经检测不含有上述 8 个化学成分），精密称取 9 份，每份称取约 2 粒内容物的量，将其放于 50 mL 量瓶中，向其中分别精密加入混合储备液Ⅰ或对照品储备液Ⅱ2.5、5、10 mL，各 3 份，按照“2.2.2”项下方法制备后进样检测，结果 8 个成分低、中、高 3 个质量浓度的平均回收率均在 98.78% ～ 100.7%，*RSD* 在 0.44% ～ 0.76%。

2.8　稳定性试验

取同一回收率试验样品供试品溶液（其中维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净和卡格列净的质量浓度分别为 493.2、66.82、57.04、54.68、59.58、49.49 和 52.27 μg • mL^{-1}；西格列汀的质量浓度为 113.4 μg • mL^{-1}），置于室温条件下分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL，记录峰面积，结果维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净、卡格列净和西格列汀峰面积的 *RSD* 分别为 0.94%、0.34%、0.52%、0.40%、0.50%、0.41%、0.49% 和 0.41%，说明样品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.9　实际样品检测

采用建立的方法对 6 批具有降糖作用的保健食品进行检测，通过查看样品各色谱峰的保留时间及紫外吸收光谱图，判断是否添加上述 8 种化学药物。结果显示样品中未发现保留时间和紫外谱图与维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净、卡格列净和西格列汀均一致的色谱峰，均未检出上述成分。

3　讨论

3.1　检测波长的确定

通过 8 个待筛查成分在流动相中的紫外吸收谱图特征，对检测波长进行选择。维格列汀、沙格列汀、阿格列汀、利格列汀、恩格列净、达格列净、卡格列净在 220 nm 处有较强吸收，兼顾各成分紫外吸收综合考虑，确定 220 nm 为检测波长，而西格列汀在 220 nm 处吸收较弱，选择其有相对较强吸收的 210 nm 作为检测波长。

3.2　色谱条件的优化

本试验在综合考虑 8 个成分色谱峰理论塔板数、对称因子、保留时间、分离度等方面的基础上，考察了乙腈 - 水、乙腈 -0.01 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾水溶液、乙腈 -0.1% 甲酸水溶液（用三乙胺调 pH 值至 3.0）、乙腈 -0.01 mol • L^{-1} 磷酸二氢铵水溶液（含 0.04% 辛烷磺酸钠，用磷酸调 pH 值至 3.3）、乙腈 -0.01 mol • L^{-1} 磷酸二氢铵水溶液（含 0.04% 辛烷磺酸钠，用磷酸调 pH 值至 3.0）等不同流动相体系，最终确定利用乙腈 -0.01 mol • L^{-1} 磷酸二氢铵水溶液（含 0.04% 辛烷磺酸钠，用磷酸调 pH 至 3.3）作为流动相。本研究在进行梯度洗脱条件优化的过程中发现，利格列汀与西格列汀的极性非常相近，在同一梯度或等度

洗脱条件下难以实现基线分离，经反复摸索，利用同一洗脱条件对 8 种成分同时进行分析的难度较大，并且西格列汀在 220 nm 波长处吸收弱，故将西格列汀通过等度洗脱条件单独筛查。在对混合对照品溶液进行分析的过程中，考察了包括 Agilent Zorbax C_{18}、Alltima C_{18}、Waters XBridge C_{18} 柱在内的不同品牌色谱柱，以及包括 25、30、35 ℃在内的不同柱温条件的影响，结果表明采用 Agilent Zorbax C_{18} 柱，柱温为 25 ℃时各成分之间分离度良好，并且色谱峰具有良好的对称性，理论塔板数均在 12 000 以上。

参考文献

[1] 余小平，王也，周静安，等 . 快速筛查检验保健食品及中成药中的 12 种化学降糖药 [J]. 药物分析杂志，2013，33（6）：1003-1006.

[2] 欧贝丽，盛静，屠婕红，等 . 快速筛查检测中成药及保健品中添加的 3 种双胍类化学降糖药物 [J]. 中国药师，2014，17（8）：1263-1267.

[3] 徐硕，金鹏飞，徐文峰，等 . 补肾壮阳类药品中非法添加化学药物检测技术的研究进展 [J]. 西北药学杂志，2017，32（5）：677-680.

[4] 赵琪，钱叶飞，贾昌平，等 . UPLC-DAD 快速筛查抗风湿类保健食品及中成药中非法添加的 19 个化学物质 [J]. 药物分析杂志，2019，39（12）：2171-2177.

[5] 徐硕，金鹏飞，徐文峰，等 . 离子迁移谱技术在中药和保健品中非法添加化学药物检测中的应用 [J]. 中南药学，2020，18（4）：620-626.

[6] 陈华龙，蓝献泉，刘旺培，等 . 保健食品中违法添加双氯芬酸钠免疫层析筛查方法的建立 [J]. 中南药学，2017，15（10）：1434-1437.

[7] 连云岚，董培智 . HPLC 法快速筛查保健食品中非法添加的 7 种化学药品 [J]. 山西医科大学学报，2017，48（11）：1165-1168.

[8] Jin PF，Liang XL，Wu XJ，et al. Screening and quantification of 18 glucocorticoid adulterants from herbal pharmaceuticals and health foods by HPLC and confirmed by LC-Q-TOF-MS/MS [J]. Food Addit Contam Part A，2018，35（1）：10-19.

[9] 金舒，杨敏智，申兰慧 . HPLC-DAD 法同时测定降压类保健食品中非法添加的 12 种化学成分 [J]. 药学与临床研究，2019，27（1）：25-28.

[10] 徐硕，金鹏飞，徐文峰，等 . 高效液相色谱检测中成药及保健品中非法添加 14 个降血脂类化学药物的研究 [J]. 药物分析杂志，2020，40（12）：2209-2220.

[11] 何睿偲，黄艳婷，雷毅，等 . HPLC 法快速筛查抗风湿类中成药或保健食品中 21 种非法添加化学成分 [J]. 分析测试学报，2016，35（11）：1486-1490.

[12] 李梦怡，吴迪，董喆，等 . HPLC-Q-TOF/MS 法快速筛查及定量分析辅助降血压类保健食品中的 15 种非法添加药物 [J]. 药物分析杂志，2020，40（2）：260-267.

[13] Wang XB，Zheng J，Li JJ，et al. Simultaneous analysis of 23 illegal adulterated aphrodisiac chemical ingredients in health foods and Chinese traditional patent medicines by ultrahigh performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Food Drug Anal，2018，26（3）：1138-1153.

[14] 郑文燕，李哲，陈梅，等 . LC-MS/MS 法检测中成药及保健品中减肥和降糖类的非法添加药物 [J]. 沈阳药科大学学报，2018，35（1）：58-66，82.

[15] 刘静，董宇，姜鑫，等 . LC-MS 测定止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学药物 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（7）：851-855.

[16] 徐硕，金鹏飞，徐文峰，等 . 中药和食品中大豆异黄酮分析方法的研究进展 [J]. 西北药学杂志，2021，36（1）：166-169.

[17] 王骏，胡梅，张卉，等 . 二极管阵列检测器在食品分析中的应用 [J]. 食品与发酵工业，2008，34（8）：154-157.

[18] 张群子，范瑛，汪年松 . 二肽基肽酶 4 抑制剂在糖尿病肾病患者中的应用和疗效评价 [J]. 世界临床药物，2020，41（10）：758-763.

[19] 白亚飞，陈汝满，徐明芝，等 . 二肽基肽酶 4 抑制剂在控制 2 型糖尿病透析患者代谢指标中的作用 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（15）：1653-1658.

[20] 金泽彬，贺颖，李正祎，等 . 二肽基肽酶 -4 抑制剂治疗 2 型糖尿病研究进展 [J]. 吉林医药学院学报，2021，42（4）：308-310.

[21] 王雪，孙冠男，田会景，等 . 二肽基肽酶 4 抑制剂对 2 型糖尿病疗效的网状 Meta 分析 [J]. 中国药物评价，2021，38（3）：235-244.

[22] 姚路红，张军 . SGLT2 抑制剂在老年糖尿病人群中应用的相关研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志，2021，13（7）：895-896.

[23] 杨莲花，陈星华 . 钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂在非糖尿病慢性肾脏病患者中应用的研究进展 [J]. 微循环学杂志，2021，31（3）：81-85.

[24] 吴桃梨，王彤，祝开思 . 钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂对糖尿病肾脏保护作用的研究进展 [J]. 山东医药，2019，59（14）：96-98.

[25] 徐文峰，金鹏飞 . 降糖类中成药和保健食品中非法添加化学药物检测技术的研究进展 [J]. 中南药学，2016，14（11）：1233-1237.

[26] Tahrani AA，Barneet AH. Dapagliflozin：a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor in development for type 2 diabetes [J]. Diabetes Ther，2010，1（2）：45-56.

[27] Jin PF，Xu S，Xu WF，et al. Screening and quantification of fourteen synthetic antidiabetic adulterants in herbal pharmaceuticals and health foods by HPLC and confirmation by LC-Q-TOF-MS/MS [J]. Food Addit Contam Part A，2020，37（1）：11-18.

（收稿日期：2022-11-13；修回日期：2022-12-18）

HPLC-DAD 测定止咳平喘类中成药中 12 种化学药物

汤慧，张萍，吴静，金阳，陈瑶，黄越（安徽省芜湖市食品药品检验中心，安徽　芜湖　241000）

摘要：目的　建立一种灵敏、可靠且能快速筛查止咳平喘类中成药中多种添加化学药物的检测方法。**方法**　采用甲醇超声提取样品中止咳平喘类化学药物，并用高效液相色谱 - 二极管阵列检测器（HPLC-DAD）测定其含量。采用 Platisil ODS 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以 0.5% 甲酸 - 乙腈为流动相进行梯度洗脱，检测波长为 250 nm，流速为 1.0 mL • min^{-1}，柱温为 30 ℃。**结果**　12 种化学药物在相应的浓度范围内与其对应峰面积呈良好的线性关系，相关系数均大于 0.999。样品平均回收率为 98.6% ～ 100.3%，*RSD* 为 1.3% ～ 2.1%。应用该方法对 10 批次样品进行检测，均未检出阳性成分。**结论**　本方法操作简便、快捷，精密度、稳定性、重复性好，能够达到快速检测止咳平喘类中成药中多种非法添加化学药物的目的。

关键词：高效液相色谱 - 二极管阵列检测器；止咳平喘；非法添加；快速筛查；含量测定；中成药
中图分类号：R927，R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1917-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.036

Determination of 12 illegally added chemical drugs in antitussive Chinese traditional patent medicine by HPLC-DAD

TANG Hui, ZHANG Ping, WU Jing, JIN Yang, CHEN Yao, HUANG Yue (*Wuhu Institute for Food and Drug Control, Wuhu Anhui* 241000)

Abstract: Objective　To develop a quick and sensitive method for the determination of illegally added chemical drugs in antitussive Chinese traditional patent medicine. **Methods**　The samples were extracted by ultrasonic with methanol and the chemical drugs content was determined by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). The separation was performed on Platisil ODS column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with 0.5% formic acid and acetonitrile as the mobile phase by gradient elution at the flow rate of 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 30 ℃ , and the detection wavelength was set at 250 nm for the qualification and quantification. **Results**　The calibration curves were linear within the ranges of corresponding concentration. The correlation coefficients were above 0.999. The average recoveries of the sample were 98.6% ～ 100.3% with *RSD*s at 1.3% ～ 2.1%. All the 10 batches of samples detected were negative. **Conclusion**　The method is simple, accurate, stable and reproducible, and can be used for the rapid determination of 12 illegally added chemicals in antitussive Chinese traditional patent medicine.
Key words: HPLC-DAD; antitussive; illegally addition; rapid determination; content determination; Chinese traditional patent medicine

随着工业的发展，环境污染日益严重，呼吸道疾病尤其是慢性呼吸道疾病的患病比例不断攀升。呼吸系统疾病已成为我国发病形势严峻、疾病负担严重的疾病。有研究报道[1]显示，截止至 2019 年 6 月，我国 20 岁及以上人群哮喘患病率为 4.2%，患病人数达到 4570 万。由于哮喘为慢性疾病，目前尚无有效根治药物，给患者带来极大的痛苦。与西药相比，中成药作用温和、不良反应较少，受到广大患者青睐。社会上一些不良企业利用这一心理，在止咳平喘类中药制剂中非法添加多种化学药物，以达到迅速缓解和治疗的目的，但其用药人群和用药剂量难以得到有效控制，势必对患者身体健康造成严重威胁。

目前，止咳平喘类中药中非法添加的化学成

基金项目：安徽省药品监督管理局科技创新项目（No. AHYJ-KJ-202012）。
作者简介：汤慧，女，副主任药师，主要从事药品质量控制与监管方面的研究，email：tanghui204@163.com

分，主要为中枢性和外周性镇咳药、肾上腺受体激动药、平喘药、糖皮质激素类以及抗菌药物类[2-3]。对于这些非法添加化学药物的测定已有多篇报道[2, 4-8]，其中大多采用质谱法，但非法添加量通常较大，容易造成污染出现假阳性，且涉及的仪器价格昂贵，检测成本高，不适合基层检验机构。也有报道用新技术检测止咳平喘类中药中非法添加的化学药物[9-10]，但所检测化学药物种类少。因此，亟待建立一种便捷、灵敏、可靠且能快速筛查止咳平喘类中成药中多种添加化学药物的检测方法，以打击制假掺伪等不法行为。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪配有二极管阵列检测器 DAD（沃特世科技有限公司）；Mettler XP 205 电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]；KQ5200DE 型高功率数控超声仪（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

沙丁胺醇（批号：100204-201103，含量：99.7%）、盐酸克仑特罗（批号：100072-201503，含量：90.5%）、茶碱（批号：100121-201805，含量：99.9%）、盐酸氨溴索（批号：100599-202106，含量：100.0%）、盐酸苯海拉明（批号：100066-202108，含量：99.8%）、盐酸异丙嗪（批号：100422-202004，含量：99.5%），盐酸溴己新（批号：100427-201903，含量：99.8%）、磺胺甲噁唑（批号：100025-201906，含量：99.8%）、醋酸氢化可的松（批号：100013-201408，含量：99.5%）、醋酸泼尼松（批号：100012-202108，含量：99.7%）、地西泮（批号：171225-201805，含量：99.9%）（中国食品药品检定研究院）；西马特罗（批号：21060848，含量：99.6%，坛墨质检 - 标准物质中心）。甲酸为分析纯（国药集团化学试剂有限公司），甲醇、乙腈均为色谱纯（默克有限公司），水为超纯水；样品来自芜湖市药品批发部门在售中成药 6 个品种共 10 批次（蛇胆陈皮胶囊 1 批，小儿咳喘灵颗粒 2 批，咽炎片 2 批，二陈丸 1 批，小儿化痰止咳颗粒 2 批，小儿肺热咳喘颗粒 2 批）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Platisil ODS（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A：0.5% 甲酸，流动相 B：乙腈，按表 1 程序进行梯度洗脱；检测波长：250 nm，同时用 DAD 监测，检测波长：190 ～ 400 nm，分辨率：1.2 nm；流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；进样体积：20 μL。

表 1 流动相洗脱程序

Tab 1 Mobile phase elution procedure

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	92	8
8	60	40
20	45	55
30	35	65
33	92	8
43	92	8

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取西马特罗、盐酸克仑特罗、茶碱、盐酸氨溴索、盐酸异丙嗪、盐酸溴己新、磺胺甲噁唑、醋酸氢化可的松、醋酸泼尼松、地西泮对照品各 10 mg（按纯度折算后），分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，制成每 1 mL 含 1 mg 的储备液。精密称取沙丁胺醇对照品 100 mg（按纯度折算后）置于 5 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，制成每 1 mL 含 20 mg 的储备液。精密称取盐酸苯海拉明对照品 50 mg（按纯度折算后）置于 5 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，制成每 1 mL 含 10 mg 的储备液。4 ℃避光保存。临用时，精密量取上述储备液各 1 mL 置于同一 20 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取供试品一次服用量（片剂 2 片，除去包衣；胶囊剂 2 粒，取内容物；丸剂 10 丸；颗粒剂 1 g），研细，置于具塞锥形瓶中，加甲醇 10 mL，超声处理 20 min，放至室温，滤过，作为供试品溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图（见图 1）。从色谱图中可以看出 12 种化学药物均达到基线分离。

2.4 精密度试验

取同一混合对照品溶液，连续进样 6 次，计算沙丁胺醇、西马特罗、盐酸克仑特罗、茶碱、盐酸氨溴索、盐酸苯海拉明、盐酸异丙嗪、盐酸溴己新、磺胺甲噁唑、醋酸氢化可的松、醋酸泼尼松、地西泮色谱峰峰面积的 *RSD* 分别为 0.49%、0.12%、0.28%、0.50%、0.63%、0.30%、0.52%、0.14%、0.53%、0.32%、0.11%、0.17%（n = 6）。保留时间的 *RSD* 分别为 0.27%、0.14%、0.26%、0.090%、0.080%、0.070%、0.050%、0.040%、0.040%、0.11%、0.070%、0.060%（n = 6）。

2.5 线性关系、检测限及定量限

依次精密量取“2.2.1”项下配制好的对照品储备液 1.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容并摇匀，依次梯度稀释，配制成系列质量浓

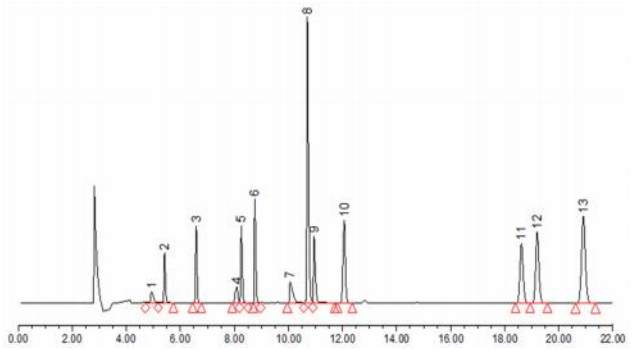


图 1　12 种止咳平喘类化学药物的 HPLC 图谱

Fig 1　Chromatograms of 12 antitussive chemical drugs

1. 沙丁胺醇（albuterol）；2. 西马特罗（cimaterol）；3. 茶碱（theophylline）；4，5. 盐酸克仑特罗（clenpenterol hydrochloride）；6. 盐酸氨溴索（ambroxol hydrochloride）；7. 盐酸苯海拉明（diphenhydramine hydrochloride）；8. 盐酸异丙嗪（promethazine hydrochloride）；9. 盐酸溴己新（bromhexine hydrochloride）；10. 磺胺甲噁唑（sulfamethoxazole）；11. 醋酸氢化可的松（hydrocortisone acetate）；12. 醋酸泼尼松（prednisone 21-acetate）；13. 地西泮（diazepam）

度对照品溶液，进样测定，以对照品进样量（*X*，μg）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标，绘制标准曲线，计算回归方程；以信噪比（*S/N*）为 3∶1 和 10∶1 为基准，推测各化合物的检测限（LOD）和定量限（LOQ）。结果见表 2。

2.6　重复性试验

取其中一份样品（阴性），精密称取 6 份，每份约 1 g，置于 10 mL 量瓶中，各加入适量盐酸异丙嗪对照品，使其终浓度相同，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱峰面积。结果盐酸异丙嗪峰面积的 *RSD* 小于 2.0%。

2.7　稳定性试验

取同一混合对照品溶液分别于 0、6、12、24、48、72 h 进样，测定其峰面积，计算各成分峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明混合对照品溶液在 72 h 内稳定。

表 2　12 种化学药物线性关系及检测下限、定量下限

Tab 2　Linear equation，linearity，correlation coefficient (*r*)，LOD and LOQ for 12 chemical drugs

成分	线性范围 /（μg·mL^{-1}）	回归方程	*r*	LOD/μg	LOQ/μg
沙丁胺醇	65 ～ 10 000	$y = 345.3x - 6.887\times10^{3}$	1.000	0.400	1.300
西马特罗	1.0 ～ 1000	$y = 1.505\times10^{4}x + 2.243\times10^{4}$	1.000	0.006	0.020
茶碱	0.8 ～ 500	$y = 2.327\times10^{4}x - 1.990\times10^{4}$	0.9995	0.005	0.016
盐酸克仑特罗	0.9 ～ 1000	$y = 3.178\times10^{4}x + 7.118\times10^{4}$	1.000	0.006	0.018
盐酸氨溴索	1.0 ～ 1000	$y = 3.039\times10^{4}x + 7.609\times10^{4}$	0.9995	0.004	0.020
盐酸苯海拉明	10 ～ 1000	$y = 1.812\times10^{3}x - 92$	1.000	0.066	0.200
盐酸异丙嗪	0.5 ～ 500	$y = 9.859\times10^{4}x + 1.326\times10^{4}$	0.9990	0.001	0.004
盐酸溴己新	1.0 ～ 1000	$y = 2.405\times10^{4}x + 7.171\times10^{4}$	1.000	0.006	0.020
磺胺甲噁唑	0.7 ～ 1000	$y = 2.722\times10^{4}x + 7.256\times10^{4}$	0.9990	0.004	0.014
醋酸氢化可的松	2.0 ～ 1000	$y = 3.085\times10^{4}x + 5.611\times10^{4}$	0.9990	0.008	0.026
醋酸泼尼松	1.0 ～ 1000	$y = 3.496\times10^{4}x + 7.590\times10^{4}$	0.9990	0.010	0.027
地西泮	0.5 ～ 500	$y = 1.085\times10^{4}x + 2.871\times10^{4}$	1.000	0.003	0.010

2.8　回收试验

取其中一份样品（阴性），精密称取 6 份，每份约 1 g，置于 10 mL 量瓶中，分别精密加入“2.2.1”项下混合对照品溶液 5 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再进样测定，计算回收率。结果 12 种成分的平均回收率均在 98.6% ～ 100.3%，*RSD* 值在 1.3% ～ 2.1%，符合方法学要求。

2.9　样品测定

2.9.1　样品测定　按“2.2.2”项下方法处理样品，进样测定。10 批中成药供试品溶液色谱中如检出与对照品溶液保留时间相同的色谱峰，采用 DAD 比较相应色谱峰的紫外 - 可见吸收光谱来进行初筛。结果 10 批样品均未检出非法添加成分。

2.9.2　模拟阳性样品测定　选取 1 号样品（阴性），精密称取 0.5 g，置于 10 mL 量瓶中，精密加入“2.2.1”中混合对照品溶液 5 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱峰面积，12 种添加化学药物均能有效检出，峰 1 到峰 13 与图 1 中相对应，其中峰 3 与样品峰 a 重叠，峰 9 与样品峰 d 重叠，但吸收光谱完全不同，光谱及色谱图见图 2。

3　讨论

3.1　色谱条件优化

本方法中流动相的选择，在参考相关文献[4, 11-14]的基础上，考察了混合对照品溶液在 0.1% 甲酸 - 甲醇、0.1% 三氟乙酸 - 乙腈、20 mmol•L^{-1} 乙酸铵 - 甲醇、50 mmol•L^{-1} 乙酸铵 - 乙腈等流动相系统中的等度和梯度洗脱的色谱行为，最终采用了 0.5% 甲酸 - 乙腈为流动相进行梯度洗脱，在此流动相体系下各组分分离度良好。

3.2　波长确定

设置 DAD 波长为 190 ～ 400 nm，从记录的 3D 色谱图中分别提取各物质的吸收光谱，并观察不同检测波长下 12 种化学药物的色谱峰面积

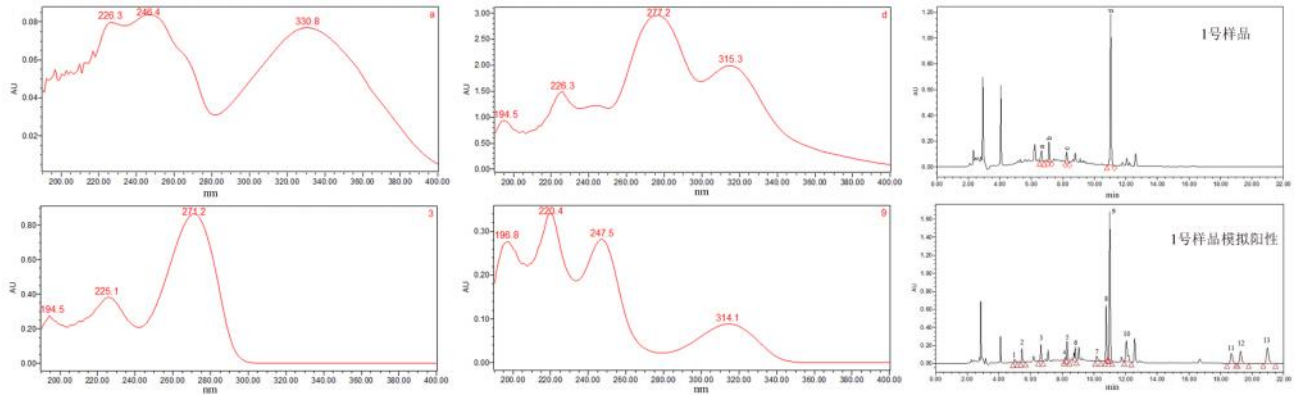


图 2 1 号样品及模拟阳性的光谱和 HPLC 图谱

Fig 2 Ultraviolet spectra and chromatograms of No.1 sample and simulated sample

大小，结果西马特罗、盐酸克仑特罗、盐酸氨溴索、盐酸异丙嗪、盐酸溴己新、醋酸氢化可的松和醋酸泼尼松在 250 nm 附近达到吸收峰值，另外 5 种化学药物也有明显吸收，故选择 250 nm 作为定量检测波长。

3.3 方法的有效性

本试验建立了一种灵敏、可靠且能快速筛查止咳平喘类中成药中多种添加化学药物的检测方法，出峰时间短，12 种化学药物在 23 min 内全部出峰，大大提高了筛查效率。在方法建立的初期，根据文献调研选取了 17 种非法添加物，在方法摸索过程中去掉了 5 种响应值小、相对不常用的化学药物。本方法的检测灵敏度已经过验证，可以满足监管需要，而且能达到治疗效果的非法添加量通常比较大，远远大于检测灵敏度，再加上检测样品时会利用 3D 图谱在目标添加物的保留时间处查看全波段吸收，不会出现假阴性结果。本试验所检 10 批样品，阳性率为 0，均未检出非法添加成分，一定程度上说明正规厂家所生产的有批准文号的止咳平喘类产品质量可靠，能保证用药安全。为进一步验证方法的准确性，本试验还进行了模拟阳性样品的检测，检出率为 100%，说明该方法对上述 12 种非法添加的止咳平喘类化学药物具有很好的识别性，可以用于止咳平喘类产品非法添加的快速筛查工作。

由于经费限制，课题组所检样品购买渠道单一，品种有限，代表性还有所不足。目前已建立相应的筛查数据库，期待更多的检验机构能使用该数据库进行筛查，扩大样本品种和数量，进一步完善和确证本检测方法。

参考文献

[1] Huang KW，Yang T，Xu JY，et al. Prevalence，risk actors，and management of asthma in China：a national cross-sectional study [J]. Lancet，2019，394（10196）：407-418.

[2] 李奕婧，李晓琳，韩家忠，等 . HPLC-DAD-MS/MS 检测止咳平喘类中药制剂中非法添加的 12 种化学药品 [J]. 药学学报，2017，52（6）：959-963.

[3] 徐硕，徐文峰，金鹏飞，等 . 止咳平喘类中成药和保健品中非法添加化学药物检测技术的研究进展 [J]. 中南药学，2017，15（6）：798-803.

[4] 刘静，董宇，姜鑫，等 . LC-MS 测定止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学药物 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（7）：851-855.

[5] 张崇生，倪赞，叶建晨，等 . 超高效液相色谱 - 串联三重四级杆质谱法测定中成药及保健食品中非法添加的 15 种抗组胺类化学成分 [J]. 中南药学，2021，19（5）：954-957.

[6] 田甜，覃艳淑，赵德恩，等 . 食品和保健食品中非法添加药物的筛查探究 [J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（3）：1200-1208.

[7] 王艳红，王广珠，张任男，等 . HPLC-MS/MS 法同时测定止咳平喘类中成药中添加的 7 个化学抗菌类物质 [J]. 药物分析杂志，2021，41（8）：1399-1407.

[8] 王任，吴鸳鸯，胡磊，等 . 全自动固相萃取 -UPLC-MS/MS 法检测清咽类保健食品中非法添加的盐酸二氧丙嗪和沙丁胺醇 [J]. 食品工业科技，2021，42（16）：271-278.

[9] 郭亚格，李珺沫，刘圆圆，等 . 微波提取 - 电喷雾电离 - 离子迁移谱法快速筛查止咳平喘化痰类中成药中 4 种化学成分 [J]. 分析科学学报，2020，36（6）：863-868.

[10] 董嘉媚 . 基于适配体对止咳平喘中成药中非法添加沙丁胺醇的快速检测研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2020.

[11] 郭常川，邢晟，许嘉平，等 . 中成药和保健食品中非法添加 38 种激素的快速筛查 [J]. 中成药，2020，42（4）：949-954.

[12] 李岳，李珉，纪宏，等 . 利用高分辨四级杆静电场轨道阱质谱快速定性和定量筛查确证中药保健品中的 114 种非法添加药物 [J]. 中国药学杂志，2019，54（21）：1804-1816.

[13] 孙晓，李卓，荀英，等 . HPLC-MS/MS 法同时测定止咳平喘类中成药中非法添加化学药物 [J]. 中成药，2019，41（10）：2405-2409.

[14] 彭彦，杨直，金朦娜，等 . 固相萃取净化 -UPLC-MS/MS 法同时测定中成药及保健食品中添加的 17 个抗过敏类化学成分 [J]. 药物分析杂志，2019，39（6）：1115-1126.

（收稿日期：2022-10-28；修回日期：2023-03-13）

电感耦合等离子体质谱法测定盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液中 24 种元素杂质的含量

赵冯，张杞柳，张石楠，陈辉*（徐州市检验检测中心，江苏　徐州　221000）

摘要：目的　建立电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）法同时测定盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液中 24 种元素杂质的含量。**方法**　样品直接稀释后分析，内标元素为钪（45），铟（115），铋（209）。内标液添加 5% 异丙醇进行基质匹配。射频功率 1550 W，He 气模式，雾化气流量 0.7 L • min^{-1}，补偿气流量 0.3 L • min^{-1}。**结果**　24 种元素在各自的检测浓度范围内线性关系良好（$r > 0.999$）。检测限为 0.000 04 ～ 0.04 ng • mL^{-1}，加标回收率为 77% ～ 113%，重复性 *RSD* 在 1.0% ～ 6.8%，中间精密度 *RSD* 在 1.3% ～ 7.9%。不同厂家的盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液中的 24 种元素杂质含量均符合人用药品技术要求国际协调理事会（ICH）的相关规定。**结论**　本实验建立的检测方法简便快速，准确灵敏，可用于盐酸左氧氟沙星注射液中元素杂质的质量控制。

关键词：盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液；ICP-MS；ICH Q3D；元素杂质；基质匹配
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1921-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.037

Content determination of 24 element impurities by ICP-MS in levofloxacin hydrochloride and sodium chloride injection

ZHAO Feng, ZHANG Qi-liu, ZHANG Shi-nan, CHEN Hui* (*Xuzhou Inspection Testing Center, Xuzhou Jiangsu* 221000)

Abstract: Objective　To simultaneously determine 24 impurities in levofloxacin hydrochloride and sodium chloride injection by inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS). **Methods** Samples were analyzed after direct dilution. Sc (45), In (115) and Bi (209) were used as the internal standard. The internal standard solution was supplemented with 5% isopropanol for matrix matching. Radio frequency power was set at 1550 W, He gas mode, and the nebulizer gas flow was set at 0.7 L • min^{-1}, and make up gas flow was set at 0.3 L • min^{-1}. **Results**　The 24 elements showed good linearity in the specified concentration range with all the correlation coefficients (*r*) above 0.999. The detection limits ranged 0.000 04 ～ 0.04 ng • mL^{-1}, the recoveries ranged 77% ～ 113%, and the repeatability and intermediate precision ranged 1.0% ～ 6.8% and 1.3% ～ 7.9%, respectively. The content of 24 elemental impurities in levofloxacin hydrochloride and sodium chloride injection from different manufacturers met the ICH requirements. **Conclusion**　The established method is simple, rapid, accurate, and sensitive, and suitable for the impurity control in levofloxacin hydrochloride and sodium chloride injection.

Key words: levofloxacin hydrochloride and sodium chloride injection; ICP-MS; ICH Q3D; element impurity; matrix matching

盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液为临床上常用的大容量静脉注射剂，适用于敏感细菌引起的中、重度感染，如呼吸系统感染[1]，生殖系统感染[2]等，其抗菌谱广，抗菌力强。该品种现行有效的国家标准规定了重金属检查项[3]，方法采用显色比较法，原理为在规定条件下与硫代乙酰胺

基金项目：江苏省市场监督管理局科技计划项目（No.KJ21125019）。
作者简介：赵冯，女，副主任药师，主要从事药品质量分析与研究，email：272829732@qq.com　*通信作者：陈辉，男，主任药师，主要从事药物分析方面的研究，email：164926758@qq.com

或硫化钠作用而显色[4]，和标准铅溶液的显色反应进行比对，通过目测以确定是否超出限度。该方法目前广泛应用于我国大容量注射剂的质量标准中，但其存在主观误差较大，且无法分析单个元素的浓度等缺陷，具有较大局限性[5]。

近年来，对元素杂质的质量控制得到不断重视。人用药品技术要求国际协调理事会（ICH）Q3D[6]基于对风险控制的要求，根据元素的毒性及其在药品中出现的可能性，将指导原则中的元素分为 1、2、3 类和毒性较低的其他元素。其中前 3 类风险较高的元素杂质根据不同给药途径给出了不同的限度（允许日暴露量，PDE）。虽然质量要求不断提高，但目前对药物中元素杂质进行的研究较少，且多集中于针剂或中药制剂中，而对临床用量较大更需要控制元素杂质的大容量注射剂研究较少。

电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）法具有灵敏度高、检测限低且可同时分析多种金属元素等优点，已在元素杂质分析中广泛应用。本研究建立 ICP-MS 法，对盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液中 ICH Q3D 规定的 24 种元素杂质进行考察，以期为该品种及其他大容量注射剂中的元素杂质的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

7900 电感耦合等离子体质谱仪（美国安捷伦公司），XS205DU 电子天平（梅特勒托利多公司，精度：0.1 mg），MilliporeMilli-Q 超纯水机（Millipore 公司）。

1.2 试药

硝酸（批号：20211215，电子级，国药集团化学试剂有限公司）；盐酸（批号：2101291，优级纯，西陇科学股份有限公司）；异丙醇（批号：K53060340107，色谱纯，德国默克公司）；超纯水（MilliporeMilli-Q 超纯水机处理后的去离子水），实验所用容器材质均为聚丙烯。注射药物元素混标 class1&2A[批号：S2-MEB709074，含砷（As）15 μg • mL^{-1}、镉（Cd）2 μg • mL^{-1}、钴（Co）5 μg • mL^{-1}、铅（Pb）5 μg • mL^{-1}、汞（Hg）3 μg • mL^{-1}、镍（Ni）20 μg • mL^{-1}、钒（V）10 μg • mL^{-1}，Inorganic VENTURES 公司]；注射药物元素混标 class2B [批号：S2-MEB709076，含金（Au）100 μg • mL^{-1}，铱（Ir）、锇（Os）、钯（Pd）、铂（Pt）、铑（Rh）、钌（Ru）均为 10 μg • mL^{-1}，硒（Se）80 μg • mL^{-1}，银（Ag）10 μg • mL^{-1}，铊（Tl）8 μg • mL^{-1}，Inorganic VENTURES 公司]；注射药物元素混标 class3 [批号：S2-MEB709070，含锑（Sb）9 μg • mL^{-1}，钡（Ba）70 μg • mL^{-1}，铬（Cr）110 μg•mL^{-1}，铜（Cu）30 μg•mL^{-1}，锂（Li）25 μg • mL^{-1}，钼（Mo）150 μg • mL^{-1}，锡（Sn）60 μg • mL^{-1}，Inorganic VENTURES 公司]；Au 单元素标准溶液（批号：0111978523，1000 μg • mL^{-1}，Aglient 公司）；内标标准液 [批号：0011332062，含锂（Li），钪（Sc），钇（Y），铟（Im），铽（Tb），铋（Bi）均为 100 mg • L^{-1}，Aglient 公司]。盐酸左氧氟沙星注射液（规格：100 mL，含左氧氟沙星 0.2 g 和氯化钠 0.9 g。四川科伦药业有限公司，批号：D20091103A，广州彼迪药业有限公司，批号：20220310，20220201，说明书最大日剂量为 0.6 g）。

2 方法与结果

2.1 仪器工作条件

检测模式为 He 气模式，He 气流量 4.5 L•min^{-1}，射频功率 1550 W，等离子体气流量 15.0 L • min^{-1}，雾化气流量 0.7 L • min^{-1}，补偿气流量 0.3 L • min^{-1}，进样深度 8 mm，重复次数为 3 次，扫描次数为 100 次。蠕动泵转速 0.1 r • s^{-1}，雾化室温度 2.0 ℃，采样锥类型为铜基镍尖，透镜偏转电压 4.0 V，能量歧视 5.0 V。

2.2 溶液制备

2.2.1 标准曲线溶液的制备　取注射药物元素混标 class1&2A 100 μL，注射药物元素混标 class2B 100 μL，Au 单元素标准溶液 20 μL，注射药物元素混标 class3 1.00 mL，用 2% 硝酸和 2% 盐酸混合溶液稀释并定容至 30.00 mL，作为多元素混合标准储备液。取混合标准储备液 0、0.30、0.50、1.00、1.50、2.00 mL，用 2% 硝酸和 2% 盐酸混合溶液稀释定容至 20.00 mL，制备成 0、0.3J、0.5J、1.0J、1.5J、2.0J 线性溶液。J 值等于各元素的限度除以日最大剂量再除以样品稀释倍数。

2.2.2 内标溶液的制备　取内标标准液 500 μL，加入 2.5 mL 异丙醇，用 2% 硝酸和 2% 盐酸混合溶液稀释并定容至 50.00 mL。内标溶液中，含 5% 异丙醇，作为基质匹配。

2.2.3 供试品溶液的制备　精密量取盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液 1 mL，用 2% 硝酸和 2% 盐酸混合溶液稀释至 20.00 mL，摇匀。

2.3 测定法

本实验选用 ^{45}Sc、^{115}In、^{209}Bi 为内标元素，其中目标同位素 ^{7}Li、^{51}V、^{52}Cr、^{59}Co、^{60}Ni、^{63}Cu、^{75}As、^{78}Se 以 ^{45}Sc 为内标，^{95}Mo、^{101}Ru、^{103}Rh、

^{105}Pd、^{107}Ag、^{111}Cd、^{118}Sn、^{121}Sb、^{137}Ba 以 ^{115}In 为内标，^{189}Os、^{193}Ir、^{195}Pt、^{197}Au、^{201}Hg、^{205}Tl、^{208}Pb 以 ^{209}Bi 为内标。内标液引入方式为经内标管由 T 型三通在线引入。仪器调谐完毕后，依次引入校准空白溶液，标准曲线溶液和供试品溶液，以各元素浓度值为横坐标，目标元素与内标元素的响应（计数值 CPS）的比值（Ratio）为纵坐标，绘制标准曲线，根据标准曲线计算得到样品中各元素杂质的含量。

2.4　方法学验证

2.4.1　线性关系考察　在各元素限度浓度的 0 ～ 200% 范围内配制 6 个点，进样分析，以各元素浓度值为横坐标，Ratio 为纵坐标，绘制标准曲线，得到各元素线性方程和相关系数，结果见表 1，结果表明本方法各元素线性良好。

表 1　元素杂质回归方程、PDE 值、J 值

Tab 1　Regression equations，PDE and J value for elemental impurities

元素	回归方程	线性范围 /（ng・mL^{-1}）	r	PDE/（μg・d^{-1}）	J/（ng・mL^{-1}）	检测限（LOD）/（ng・mL^{-1}）	定量限（LOQ）/（ng・mL^{-1}）
Cd	$y=2.004\times10^{-3}x-7.567\times10^{-8}$	0.10 ～ 0.67	1.000	2	0.33	0.000 250	0.000 833
Pb	$y=1.327\times10^{-2}x+2.069\times10^{-4}$	0.25 ～ 1.67	0.9999	5	0.83	0.001 17	0.003 90
As	$y=1.106\times10^{-2}x+2.113\times10^{-4}$	0.75 ～ 5.0	1.000	15	2.5	0.004 76	0.0158
Hg	$y=6.312\times10^{-4}x+9.586\times10^{-7}$	0.15 ～ 1.00	0.9999	3	0.5	0.000 502	0.001 67
Co	$y=8.124\times10^{-2}x+1.912\times10^{-4}$	0.25 ～ 1.67	1.000	5	0.83	0.001 17	0.003 91
V	$y=3.205\times10^{-2}x+7.560\times10^{-3}$	0.50 ～ 3.33	0.9999	10	1.67	0.0284	0.0948
Ni	$y=2.327\times10^{-2}x+1.020\times10^{-3}$	1.00 ～ 6.67	1.000	20	3.33	0.004 97	0.0165
Tl	$y=9.888\times10^{-3}x+8.094\times10^{-6}$	0.4 ～ 2.67	1.000	8	1.33	0.000 25	0.000 82
Au	$y=4.923\times10^{-3}x+3.474\times10^{-4}$	15 ～ 100	0.9997	300	50	0.0133	0.0446
Pd	$y=5.563\times10^{-3}x-1.051\times10^{-4}$	0.5 ～ 3.33	0.9999	10	1.67	0.008 83	0.0294
Ir	$y=8.970\times10^{-3}x+6.349\times10^{-7}$	0.5 ～ 3.33	1.000	10	1.67	0.000 0530	0.000 177
Os	$y=2.589\times10^{-3}x+1.015\times10^{-5}$	0.5 ～ 3.33	1.000	10	1.67	0.001 37	0.004 56
Rh	$y=2.662\times10^{-2}x+1.473\times10^{-6}$	0.5 ～ 3.33	1.000	10	1.67	0.000 041	0.000 136
Ru	$y=4.486\times10^{-3}x+2.670\times10^{-6}$	0.5 ～ 3.33	1.000	10	1.67	0.000 711	0.002 37
Se	$y=9.806\times10^{-4}x-2.926\times10^{-6}$	4.0 ～ 26.67	0.9999	80	13.33	0.0395	0.131
Ag	$y=8.098\times10^{-3}x+5.105\times10^{-6}$	0.75 ～ 5.0	1.000	15	2.5	0.000 510	0.001 69
Pt	$y=3.107\times10^{-3}x+1.414\times10^{-6}$	0.5 ～ 3.33	0.9999	10	1.67	0.000 238	0.000 793
Li	$y=1.612\times10^{-4}x-1.399\times10^{-4}$	12.5 ～ 83.33	0.9999	250	41.67	0.0414	0.138
Sb	$y=4.705\times10^{-3}x+3.975\times10^{-4}$	4.5 ～ 30	1.000	90	15	0.0043	0.0143
Ba	$y=1.696\times10^{-3}x+6.114\times10^{-5}$	35.0 ～ 233.3	1.000	700	116	0.0207	0.0690
Mo	$y=3.257\times10^{-3}x+2.133\times10^{-5}$	75 ～ 500	1.000	1500	250	0.002 80	0.009 35
Cu	$y=6.769\times10^{-2}x+8.846\times10^{-3}$	15 ～ 100	1.000	300	50	0.007 38	0.0246
Sn	$y=3.375\times10^{-3}x+2.497\times10^{-3}$	30 ～ 200	1.000	600	100	0.0333	0.111
Cr	$y=4.477\times10^{-2}x+5.179\times10^{-3}$	55 ～ 366.6	1.000	1100	183	0.0173	0.0578

2.4.2　检测限与定量限　取空白溶液（稀释剂）连续测定 11 次，计算 11 次 Ratio 的标准偏差（*SD*）。按照 LOD ＝ 3*SD*/*K*、LOQ ＝ 10*SD*/*K* 计算各元素的检测限和定量限（*K* 为回归方程斜率）。结果见表 1，表明方法灵敏度良好。

2.4.3　加标回收试验　精密量取批号为 D20091103A 的注射液样品 1 mL 9 份，分别置 20 mL 量瓶中，分别加入多元素混合标准曲线储备液 0.5、1.0、1.5 mL，每个浓度平行 3 份，用 2% 硝酸和 2% 盐酸混合溶液稀释至刻度，分别作为低、中、高浓度加标供试溶液。取注射液样品 1.0 mL，用 2% 硝酸和 2% 盐酸混合溶液稀释至 20.00 mL 作为样品空白，按“2.1”项下参数进样测定，计算回收率，实验测得各元素加标回收率在 77% ～ 113%。一般要求加标回收率在 70% ～ 150%[7]，表明本方法回收率良好。

2.4.4　重复性与中间精密度　精密量取批号为 D20091103A 的注射液样品 1 mL 6 份，分别置 20 mL 量瓶中，加入多元素混合标准曲线储备液 1.0 mL，用 2% 硝酸和 2% 盐酸混合溶液稀释至刻度，进样分析，根据连续 6 次测定结果计算各元素的 *RSD*，考察重复性，要求 *RSD* 不超过 20%。由另一位试验人员在不同时间按重复性方法重新配制 6 份加标供试溶液，进行试验，考察随机变动对精密度的影响，计算 12 份次测定结果的 *RSD*，来考察中间精密度，要求 *RSD* 不超过 25%[7-8]。结果实验测得重复性 *RSD* 在 1.0% ～ 6.8%，中间

精密度 *RSD* 在 1.3% ～ 7.9%，表明本方法重复性和中间精密度良好。

2.4.5 稳定性考察 取新配制的标准曲线溶液，将重复性项下的供试溶液，放置24 h后测定，与临用新制比较，计算各元素含量的 *RSD*，考察溶液稳定性，结果实验测得稳定性 *RSD* 在 0.50% ～ 9.0%，表明本方法溶液 24 h 内稳定。

2.5 样品的检测与结果

取 3 个批次盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液，平行 2 份，分别按“2.2.3”项下方法配制供试品溶液，进样分析，计算元素杂质含量，结果见表 2，从结果中可以看出，建立的方法具有较高的灵敏度，可以检测出极微量的杂质元素，虽然各样品中杂质元素含量均低于 ICH 规定限度，但各厂家之间具有较大差异，可为企业提高生产工艺和质量控制提供有效的依据。

表 2 各元素杂质在样品中的含量 (ng・mL^{-1})

Tab 2 Content of each element impurities in the sample (ng・mL^{-1})

元素	批号			限度
	D20091103A	20220201	20220310	
Cd	0.012	0.019	0.137	6.7
Pb	0.843	1.504	4.750	16.7
As	0.104	0.186	0.231	50.0
Hg	—	—	—	10.0
Co	0.132	0.111	0.293	16.7
V	—	—	—	33.3
Ni	1.053	0.924	2.014	66.7
Tl	—	—	—	26.7
Au	—	—	—	1000.0
Pd	0.118	0.360	0.322	33.3
Ir	—	—	—	33.3
Os	—	0.073	0.040	33.3
Rh	—	—	—	33.3
Ru	—	—	—	33.3
Se	—	0.675	—	266.7
Ag	0.044	0.010	0.010	50.0
Pt	—	—	—	33.3
Li	—	—	—	833.3
Sb	0.526	0.430	—	300.0
Ba	8.529	2.535	18.693	2333.3
Mo	0.308	0.397	0.278	5000.0
Cu	1.098	0.995	2.542	1000.0
Sn	2.171	1.732	0.146	2000.0
Cr	4.469	5.913	13.649	3666.7

注：—表示未检出。

Note：— Indicates not detected.

3 讨论

3.1 目标元素的选择

ICH Q3D 基于风险管控的原则，对药品中元素杂质的限度提出了控制和评价的要求，将元素杂质分为 1 类、2 类（2A、2B）、3 类和毒性较低的其他元素。其中给出 PDE 值的前 3 类元素共 24 个，毒性较低的其他元素并未给出 PDE 值。虽然 2B 类和 3 类中有部分非必检元素，但考虑到本制剂为大容量静脉注射剂，在用药过程中，进入机体的量较大，并且目前《中国药典》中并未有相关指导原则 [9]，市售样品的元素杂质情况并不清楚。因此，本研究选择对 ICH 中已给出 PDE 值的 24 种元素进行分析测定。

3.2 基质效应的消减

本品基质中含有较高浓度的钠离子，会以电离抑制、分子离子、离子散焦等方式影响分析物信号 [10-11]。因此需要选择适当的前处理和仪器参数降低高盐基质的信号干扰 [12]。

3.2.1 前处理方法的选择 ICP-MS 检测样品前处理方法一般包括直接稀释、直接溶解 [13]、微波消解和湿法消解等，本品为澄清溶液，有机物含量不高，黏稠度较低，元素杂质含量也极低，综合考虑降低污染风险和操作便捷性，优先选择直接稀释的方法。对本制剂进行分析的难点在于，本品直接进样测定时基质效应较大，内标回收率不符合要求，需要进行稀释，但本品为大容量注射剂，由于日最大使用剂量造成进入患者体内药物的体积相对于其他种类的药物制剂来说比较大，部分目标元素杂质（如 Cd、Hg、Co、V 等）的 PDE 值又较低，如果样品稀释倍数较大，则可能造成有些元素在稀释过程中检测不出或者无法准确定量，对仪器检测限和标准曲线配制范围的要求较高。想取得较高的测量准确度，需要考察适合的样品稀释倍数以对应于适合的标准曲线浓度范围。同时待测元素中 Li 元素由于质量数较低，离子体积较小，容易受到离子散焦的影响，实验过程中发现随着稀释倍数的增加，Li 元素的加标回收率会逐渐提高，考察不同稀释倍数（0到200倍）发现，当 NaCl 质量浓度从 0.05% 降低到 0.01% 时，回收率从 75% 提高至 100% 左右。综合考虑加标回收率情况、常规雾化器样品通过性与灵敏度因素，将本品稀释倍数定为 20 倍（含 NaCl 为 0.045%）。

Ir、Os、Rh、Ru、Hg 等元素化学性质较不稳定，在用单纯硝酸稀释液稀释时加标回收率较低，且溶液稳定性测试时变化率极大，本研究采用含 2% 硝酸与 2% 盐酸的混合溶液作为稀释剂，盐酸可作为络合剂提高样品中 Hg 元素的加标回收率，并且可

以提高 Ir、Os、Rh、Ru 元素 24 h 内的稳定性。

3.2.2 内标溶液的优化 采用 ICP-MS 法进行多元素分析时，容易受到氧化物和多原子离子的干扰，样品溶液不同，元素间的浓度差异也容易引起误差。在线内标法则可有效监控和校正信号的漂移，更有效地校正误差。同时 ICP-MS 法也常存在较为明显的基体效应，考察内标回收率是发现基体效应较为有效的手段。本方法在选择分析条件时，考察了不同浓度内标溶液的影响以及单纯内标标准液配制内标溶液和添加有机试剂进行基质匹配对分析测试效果之间的差异，最终确定在内标溶液中加入 5% 异丙醇进行基质匹配，并采用不同质量数和电离能分布的 ^{45}Sc、^{115}In、^{209}Bi 多元素内标在线加入的方式 [14]，配合样品稀释，以控制内标元素的内标回收率变化趋势，可以使各内标元素的内标回收率稳定在 80% ～ 120%，并且取得较好的元素加标回收率。

3.2.3 仪器参数的优化 本样品含有较高浓度的 NaCl，为了降低高盐机体的基质效应，本研究对气体流量进行了优化，采用载气流量 0.7 L·min^{-1}，补偿气流量 0.3 L·min^{-1}，降低进入等离子体的总离子浓度，并保证足够的灵敏度。

3.2.4 结果分析 根据前期对生产企业的处方及合成工艺的调研结果可知，本制剂的原料药盐酸左氧氟沙星在生产过程中未使用金属催化剂，但在合成左氧氟环合酯工艺中使用了 *L*- 氨基丙醇，经查 *L*- 氨基丙醇的合成工艺中使用了钌催化剂，金属钌的氧化物和有机化合物对人体有较大毒性，并且会蓄积在骨骼中，可能导致长期健康危害。欧州药物评审组织（EMEA）关于金属催化剂或金属试剂残留量限度规定的指导文件将金属催化剂按风险级别分类管理，Ru 作为 1 类金属，应严格控制其残留量。因此，Ru 是需要评估的潜在风险元素杂质。本实验结果看出，3 个批次均未检出。

盐酸左氧氟沙星在生产过程中用到的反应釜、离心机、干燥机、粉碎机、过筛机的内壁均为不锈钢，其成分表中含 ICH Q3D 中需评估的 2A 类元素 Ni。但由于生产过程中的溶液均非强酸、强碱状态，无腐蚀性，从不锈钢中溶出元素杂质的可能性较低，但不排除有溶出性，因此，本研究把 2A 类元素 Ni 列入本制剂中可能存在的潜在残留元素。分析结果显示，3 个批次均有检出，但均未超出 ICH 限度。

从实验结果中看出，各样品 24 种杂质元素含量均低于 ICH 规定限度，但值得关注的是，1 类高毒性元素除 Hg 外，Pb、Cd 和 As 均有检出，其中有的批次 Pb 含量达到了限度的 30%。此外，虽然 Ru 和 Ni 的含量远低于限度，但作为潜在残留元素，对其风险监控十分有必要。

本文建立了 ICP-MS 直接测定盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液中 24 种元素杂质含量的方法并进行了方法学验证，结果表明该法灵敏度高，准确性好。对不同厂家共 3 批样品进行了检测，虽然测定的元素杂质结果都满足 ICH 限度要求，但不同厂家结果存在一定的差异，说明建立灵敏度高、准确性好的多元素杂质检测方法更有利于企业进行质量评估和控制，提高产品质量。综上，本法灵敏度高、稳定性好，快速、可靠，可为盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液及其他大容量注射剂的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 周逸琳，朱云霏 . 盐酸左氧氟沙星注射液治疗下呼吸道感染性疾病疗效分析 [J]. 基层医学论坛，2020，24（22）：3186-3188.

[2] 张红梅，赵立美 . 盐酸左氧氟沙星治疗盆腔炎的临床效果观察 [J]. 中国卫生标准管理，2021，12（20）：100-102.

[3] 国家药典委员会 . 国家药品标准新药转正标准 [S].（第 54 册），北京：人民卫生出版社，2006：195-196.

[4] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：111-112.

[5] 徐昕怡，刘贞 . 欧美药典及 ICH 元素杂质指导原则增修订历程及对中国药典的启示 [J]. 中国药事，2019，33（6）：624-629.

[6] ICH Q3D Step4. Guideline for Elemental Impurities [S]. 2022.

[7] USP-NF 2022 ＜ 233 ＞ [S]. 2022：online. https：//doi.org/10.31003/USPNF_M5193_02_01.

[8] 顾霄，朱思琪，郑金琪 . 葡萄糖酸钙注射液中 24 种元素杂质测定方法的建立 [J]. 药物分析杂志，2020，40（2）：278-284.

[9] 徐昕怡，洪小栩 . 从 ICH Q3D 元素杂质指导原则欧美药典实施历程探索《中国药典》转化路径 [J]. 中国食品药品监管，2020，5（10）：22-31.

[10] 程君琪，李青，汪正 . 不同高盐基体对电感耦合等离子体质谱法射频源的匹配特性 [J]. 理化检验（化学分册），2019，55（10）：1228-1230.

[11] 孙滨滨，黄祝刚，贾佳，等 . ICP-MS 直接进样测定小儿钠钾镁钙葡萄糖注射液中 11 种元素杂质含量 [J]. 中国药物应用与监测，2020，17（5）：302-306.

[12] 徐佳慧，韩良，马壹文，等 . ICP-MS 快速筛查多种注射剂中的元素杂质 [J]. 中南药学，2019，17（9）：1412-1416.

[13] 朱俐，赵瑜，姚尚辰，等 . 药物中元素杂质检测技术研究最新进展 [J]. 分析测试学报，2020，39（4）：547-554.

[14] 陈沫，周震宇，程继业，等 . 电感耦合等离子体质谱法测定注射用美罗培南中的 13 个元素杂质 [J]. 中国抗生素杂志，2022，47（2）：174-178.

（收稿日期：2022-10-26；修回日期：2022-11-09）

基于指纹图谱、含量测定及多元统计分析的银花感冒颗粒质量评价研究

张建平[1]，杨非凡[2]，任杰[2]，高寒[1]，塔娜[1]，周雪梅[1*]（1. 内蒙古自治区药品检验研究院，呼和浩特 010020；2. 呼和浩特市食品药品检验所，呼和浩特 010020）

摘要：目的 建立银花感冒颗粒 HPLC 指纹图谱，测定绿原酸等 6 种成分的含量，开展正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）。**方法** 采用液相色谱 - 二极管阵列检测器法，Alltima C18 色谱柱，梯度洗脱，流速为 1.0 mL·min^{-1}，柱温为 35 ℃，检测波长为 300 nm 和 251 nm；采用指纹图谱相似度评价技术，对 10 批次样品进行指纹图谱相似度评价；同时测定绿原酸等 6 种成分的含量；采用 SIMCA 14.0 软件对数据进行归一化，构建判别分类模型，对模型进行置换验证，并分析变量重要性投影值（VIP）筛选出质量标志物。**结果** 以 10 批次数据为基础建立银花感冒颗粒指纹图谱，确定 15 个共有峰，相似度均在 0.95 以上；6 种成分在相应的进样浓度范围内与峰面积的线性关系良好（$r \geq 0.998$），加样回收率均在 97.8% ～ 101.4%。OPLS-DA 分析结果显示，所构建的判别分类模型稳定性和预测能力尚可，绿原酸和甘草酸成分为银花感冒颗粒的质量标志物。**结论** 建立的指纹图谱及多成分含量测定方法简便可行、准确可靠，可用于银花感冒颗粒的质量控制，筛选出的质量标志物具有一定的科学导向意义。

关键词：银花感冒颗粒；指纹图谱；含量测定；OPLS-DA
中图分类号：R284.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1926-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.038

Quality evaluation of Yinhua Ganmao granules based on HPLC fingerprints, content determination and multivariate statistical analysis

ZHANG Jian-ping[1], YANG Fei-fan[2], REN Jie[2], GAO Han[1], TA Na[1], ZHOU Xue-mei[1*] (1. *Inner Mongolian Institute for Drug Control*, *Huhhot* 010020; 2. *Hohhot Food and Drug Inspection Institute*, *Huhhot* 010020)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of Yinhua Ganmao granules, determine the content of 6 components, and conduct orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Methods** HPLC-DAD was adopted. The determination was performed on an Alltima C18 column with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The column temperature was 35 ℃, and the detection wavelength was set at 300 nm and 251 nm. The HPLC fingerprints of 10 batches of Yinhua Ganmao granules were established with Similarty Evalutation System for TCM Chromatographic Fingerprint (2012A Edition). The content of 6 components including chlorogenic acid was determined simultaneously. SIMCA 14.0 software was used to evaluate the common peaks. **Results** The fingerprints of Yinhua Ganmao granules were established, and 15 common peaks were calibrated, and the similarity was over 0.95. Six chemical components were identified: chlorogenic acid, prim-*O*-glucosylcimifugin, cimifugin, forsythiaside A, 5-*O*-methylvisammioside and glycyrrhizic acid. Ten batches of samples were classified into two groups and 2 differential markers were screened out by OPLS-DA. The stability and predictability of the discriminant classification model were acceptable. Chlorogenic acid and glycyrrhizic acid were the quality markers of Yinhua Ganmao

基金项目：内蒙古自治区“草原英才”工程青年创新创业人才基金（No. 2022-20）。
作者简介：张建平，男，硕士，副主任技师，主要从事药物分析与质量控制研究，email：zhangjianping2007@163.com *通信作者：周雪梅，女，主任药师，主要从事药物质量管理与实验室质量管理研究，email：zhouxm726@sina.com

granules. **Conclusion**　The established HPLC method for Yinhua Ganmao granules is sample, stable and feasible. Fingeprints combined with multivariate statistical analysis can provide reference for the quality control of Yinhua Ganmao granules.

Key words: Yinhua Ganmao granule; fingerprint; content determination; orthogonal partial least squares-discriminant analysis

银花感冒颗粒为治疗风热感冒的常用中药复方制剂，由金银花、连翘、防风、桔梗、甘草五味药提取浓缩而成[1]。目前对银花感冒颗粒化学成分及质量控制的研究，主要集中在含量测定[2]、工艺研究[3]、质量标准研究[4]等方面，其现行质量标准为《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》第二册 WS_3-B0406-90，同时还有 4 个注册标准，分别为药典业发（1999）第 179 号、WS_3-B0406-90-1、YBZ00302003 和 YB205072017。上述标准中，仅局颁标准 YB205071017 有绿原酸的含量测定项，其他标准均无含量测定项目。考虑到中成药复方制剂的疗效是多组分共同作用的结果，对单一成分进行含量测定，不能全面控制其内在质量，达不到整体质量控制的目的，在中药整体质量评价体系中，指纹图谱技术应用较广[5-9]。根据银花感冒颗粒各组分的理化性质，结合各组分含量的大小，经过反复实验摸索，建立了银花感冒颗粒 HPLC 指纹图谱，并开展含量测定研究，最终确定以绿原酸（chlorogenic acid，CA）、升麻素苷（prim-*O*-glucosylcimifugin，POg）、升麻素（cimifugin，Cf）、连翘酯苷 A（forsythiaside A，FtA）、5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷（5-*O*-methylvisammioside，5-*O*-M）、甘草酸（glycyrrhizic acid，GA）为指标性成分和含量测定成分。

在掌握银花感冒颗粒多批次含量数据后，通过统计分析的技术手段，对数据进行深层次挖掘，以发现其内在规律[10-12]。开展实验研究和数理统计分析，利用正交偏最小二乘法判别分析法（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA），建立银花感冒颗粒 6 种成分与样本之间的关系，形成“有监督”的判别分类模型，以实现对样本的分类和预测、各成分对模型贡献重要程度排序等内容。

1　材料

高效液相色谱仪（岛津 LC-40）；百万分之一电子天平（赛多利斯 MSE606S）；万分之一电子天平（赛多利斯 MSA224S）；超声波清洗器（昆山 KQ-500DE）。

对照品 CA（批号：110753-202018，纯度：以 96.1% 计）、POg（批号：111522-201712，纯度：以 96.2% 计）、Cf（批号：111710-200602，纯度：以 100.0% 计）、FtA（批号：111810-201707，纯度：以 97.2% 计）、5-*O*-M（批号：111523-201610，纯度：以 96.1% 计）、GA（批号：110731-202021，纯度：以 96.2% 计）（中国食品药品检定研究院）；乙腈为色谱纯，水为去离子水，其他试剂均为分析纯。银花感冒颗粒样品购于市场（相当于总药材 15.5 g，来源及批号见表 1）。

表 1　10 批银花感冒颗粒样品信息

Tab 1　Sample of Yinhua Ganmao granules

编号	批号	规格	生产单位
S1	200203	20 g/ 袋	修正药业集团股份有限公司
S2	200202	20 g/ 袋	修正药业集团股份有限公司
S3	200204	20 g/ 袋	修正药业集团股份有限公司
S4	20200901	20 g/ 袋	吉林省康福药业有限公司
S5	20200401	20 g/ 袋	吉林省康福药业有限公司
S6	200501	10 g/ 袋	湖北御金丹药业有限公司
S7	20201001	20 g/ 袋	陕西君碧莎制药有限公司
S8	20190202	20 g/ 袋	吉林省康福药业有限公司
S9	20210202	20 g/ 袋	吉林省康福药业有限公司
S10	20201003	20 g/ 袋	陕西君碧莎制药有限公司

2　方法与结果

2.1　定量分析方法及验证

2.1.1　色谱条件　采用 Alltima C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以含 0.1% 磷酸的 80% 乙腈水溶液为流动相 A，以 0.1% 磷酸水溶液为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 20 min，95%B；20 ～ 35 min，95% ～ 83%B；35 ～ 70 min，83%B；70 ～ 100 min，83% ～ 70%B；100 ～ 120 min，70% ～ 50%B；120 ～ 130 min，50% ～ 0%B）；流速为 1.0 mL•min^{-1}；检测波长为 300 nm（测定 GA 时切换为 251 nm）；进样量为 10 μL；柱温为 35 ℃。

2.1.2　供试品溶液的制备　取供试品适量（规格为 10 g/ 袋的称取 1 g，规格为 20 g/ 袋的称取 2 g），研细，精密称取，置锥形瓶中，精密加入 90% 甲醇 10 mL，称定重量，超声处理（500 W，40 kHz）30 min，放冷并再次称定重量，用 90% 甲

醇补足减失的重量，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 取 CA、POg、Cf、FtA、5-*O*-M、GA 对照品适量，精密称定，加甲醇溶解并稀释成每 1 mL 中含 CA 0.5 mg、POg 0.05 mg、Cf 0.02 mg、FtA 0.1 mg、5-*O*-M 0.08 mg、GA 0.05 mg 的混合对照品溶液，摇匀，即得。

2.1.4 系统适用性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液进样分析，结果见图 1，可知各待测组分分离效果良好（分离度＞ 1.5）。

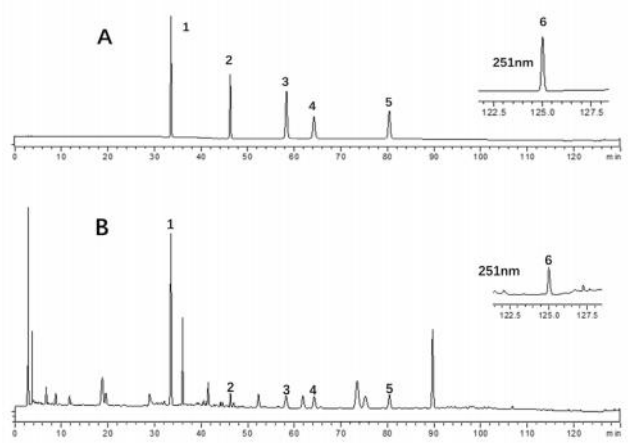


图 1 混合对照品溶液（A）及银花感冒颗粒供试品溶液（B）的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram for the reference substances（A）and the sample（B）

1. CA；2. POg；3. Cf；4. FtA；5. 5-*O*-M；6. GA

2.1.5 线性范围 分别配制不同浓度的混合对照品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以进样量（μg）为横坐标、峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 2，各成分标准曲线在线性范围内线性关系良好。

表 2 银花感冒颗粒 6 种成分的线性关系考察

Tab 2 Linearity of 6 components in Yinhua Ganmao granules

成分	线性方程	*r*	范围 /μg
CA	$y = 2.794\times10^3x - 9.305\times10^3$	1.000	0.552 ～ 11.04
POg	$y = 1.608\times10^3x - 1.494\times10^4$	0.999	0.055 ～ 1.66
Cf	$y = 2.244\times10^3x + 1.366\times10^3$	0.999	0.020 ～ 0.598
FtA	$y = 1.308\times10^3x - 3.236\times10^3$	0.998	0.106 ～ 2.66
5-*O*-M	$y = 1.765\times10^3x - 9.158\times10^3$	0.999	0.081 ～ 2.44
GA	$y = 876.6x + 614.8$	1.000	0.060 ～ 1.79

2.1.6 加样回收试验 取 S1 供试品颗粒，精密称取 0.5 g，平行 9 份，按低、中、高浓度分别精密加入上述 6 种对照品，按照“2.1.2”项下方法制备加标回收溶液，进样测定。计算加样回收率。结果 CA、POg、Cf、FtA、5-*O*-M、GA 低、中、高浓度的加样回收率分别在 97.8% ～ 99.5%、99.0% ～ 99.7%、98.2% ～ 98.8%、98.6% ～ 99.8%、100.1% ～ 101.4%、98.5% ～ 99.4%，*RSD* 均小于 2.5%。表明方法回收率良好。

2.1.7 仪器精密度试验 精密吸取同一供试品溶液（S1），连续进样 6 次。结果 CA、POg、Cf、FtA、5-*O*-M、GA 的峰面积 *RSD* 分别为 0.57%、0.84%、1.1%、0.46%、0.29%、0.55%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液（S1），分别于 0、2、4、8、12、24 h 注入液相色谱仪，记录各组分峰面积。结果 CA、POg、Cf、FtA、5-*O*-M、GA 的峰面积 *RSD* 分别为 0.28%、0.53%、0.27%、0.90%、0.67%、0.49%（$n = 6$）。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一批供试品（S1）颗粒 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进样分析并计算 6 种成分的含量重复性，*RSD* 分别为 0.26%、0.59%、1.2%、0.87%、0.75%、1.0%（$n = 6$）。表明重复性良好。

2.1.10 含量测定 取 10 批银花感冒颗粒供试品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算供试品中 6 个成分的含量，结果见表 3。

表 3 10 批银花感冒颗粒含量测定结果 (mg/ 袋)

Tab 3 Content determination of 10 batches of Yinhua Ganmao [granules/ (mg per pack)]

批号	CA	POg	Cf	FtA	5-*O*-M	GA
S1	7.9	1.5	0.5	12.6	2.3	4.2
S2	8.8	1.7	0.4	13.4	2.5	4.7
S3	8.2	1.6	0.5	14.3	2.2	4.7
S4	7.6	1.0	0.6	6.9	1.8	5.8
S5	3.9	1.8	0.5	3.5	2.5	5.1
S6	2.5	0.9	0.2	8.6	0.8	2.0
S7	6.8	2.4	0.3	17.3	2.6	3.9
S8	3.2	1.7	0.8	3.0	2.4	4.5
S9	3.1	1.7	0.6	3.9	1.9	4.1
S10	8.1	2.8	0.5	20.6	3.2	4.6
平均值	6.0	1.7	0.5	10.4	2.2	4.4

2.2 指纹图谱

2.2.1 指纹图谱共有模式的建立 按“2.1.1”项下色谱条件对 10 批银花感冒颗粒的供试品溶液进样测定，检测波长为 300 nm，记录指纹图谱，见图 2，比较各批次供试品的色谱图，考虑到峰面积的大小及分离的情况，标定共有峰 15 个，计算共有峰占比，剔除溶剂峰（从 3 min 开始计算），共有峰面积占总峰面积的 95% 以上。比较 10 批次银花感冒颗粒供试品的 HPLC 色谱图，4 号 CA 峰的峰面积较大，出峰时间适中，重复性和稳定

性较好，因此以 CA 作为参照峰（S）。根据对照品保留时间及光谱图指认了其中的 CA（4）、POg（6）、Cf（9）、FtA（11）、5-*O*-M（14）共 5 个成分，各图谱共有峰相对保留时间无显著性差异。

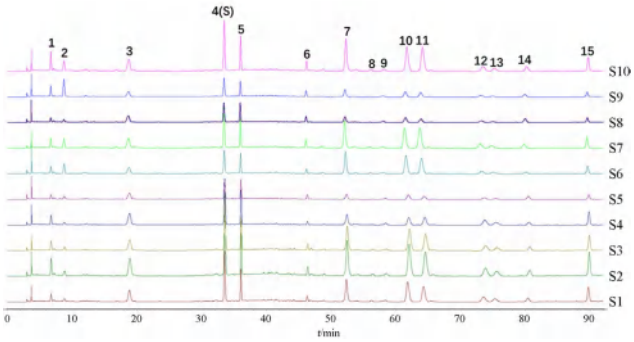


图 2　银花感冒颗粒指纹图谱（10 个批次）

Fig 2　Fingerprints for 10 batches of Yinhua Ganmao granules

2.2.2　指纹图谱的相似度评价结果　采用药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版本）”对 10 批银花感冒颗粒供试品的指纹图谱进行相似度分析、合成及标定，生成对照图谱。以 4 号峰 CA 作为参照峰 S，标定 15 个共有峰，以 S1 批供试品的指纹图谱作为参照图谱，以平均数法生成 10 批供试品的对照指纹图谱（见图 3），10 批供试品图谱与对照指纹图谱相似度分别为 0.994、0.992、0.993、0.973、0.957、0.961、0.988、0.962、0.952、0.980。结果表明银花感冒颗粒不同厂家、批次之间相似度接近、质量稳定、差异不大。

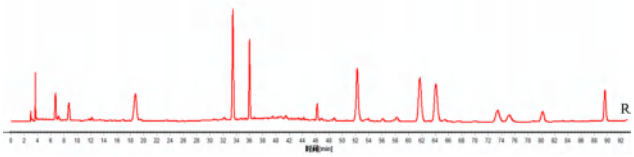


图 3　银花感冒颗粒指纹图谱对照图谱

Fig 3　Reference fingerprints of Yinhua Ganmao granules

3　多元统计分析

3.1　OPLS-DA 模型建立

采用 SIMCA 14.0 开展银花感冒颗粒 6 种成分含量测定值与样本关系的 OPLS-DA 分析。将表 3 数据导入 SIMCA 14.0 软件，样本 S1 ～ S10 按序分为两组，采用 *Par* 法（将含量值中心化后，以各含量数据除以该成分 10 批次数据标准差的算术平方根），得到归一化数据，模式选择 OPLS-DA 进行自动调整建模（Autofit），得到银花感冒颗粒 6 种成分与样本之间的分析判别模型，该模型拟合参数 R^2X 为 0.461、R^2Y 为 0.82、Q^2 为 0.716。其中 R^2X 是模型对 X 矩阵（本分析中为 6 种成分含量测定值）的解释能力，R^2Y 是模型对 Y 矩阵（本分析中为分组情况）的解释能力，Q^2 代表模型的预测能力。上述参数越接近于 1 说明模型越优秀，一般大于 0.5 即认为模型稳定且预测能力较好。10 批次样本的得分图如图 4 所示。

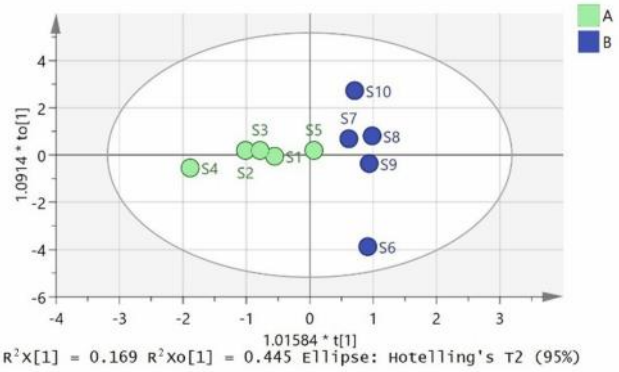


图 4　10 批次银花感冒颗粒的得分矩阵图

Fig 4　Scores plots of Yinhua Ganmao granules

3.2　模型验证

采用置换检验（permutation test）的方法对所构建的模型进行验证，在打乱“3.1”项中的分组后，进行 200 次数据循环，每次得到新的 R^2 和 Q^2 数据，与“3.1”项下构建模型的参数 R^2 和 Q^2 数据进行比较，如图 5 所示。图中可见 Q^2 数据所形成的回归线 Y 轴截距小于 0，表明所建立的模型为可靠的监督判别分析模型。

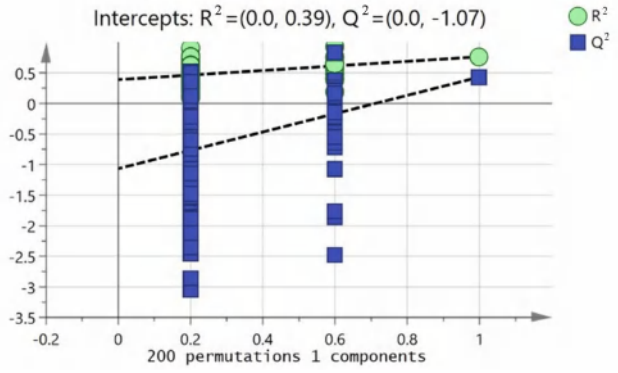


图 5　置换检验结果图

Fig 5　Permutation test

3.3　质量标志物分析

在构建的模型可行可靠的前提下，可以利用 OPLS-DA 的优点，找到最具差异性的变量，进而确定银花感冒颗粒的质量标志物。变量重要性投影值（variable importance in projection，VIP）代表每一个变量的重要性程度，一般认为该值大于 1 即对模型有较大影响。通过“3.1”项下的数据分析，得到 VIP 差异图及 VIP 值，如图 6 所示。其中，CA 和 GA 的 VIP 值大于 1，提示可以将这两个化学成分作为影响银花感冒颗粒相互间差异的质量标志物。

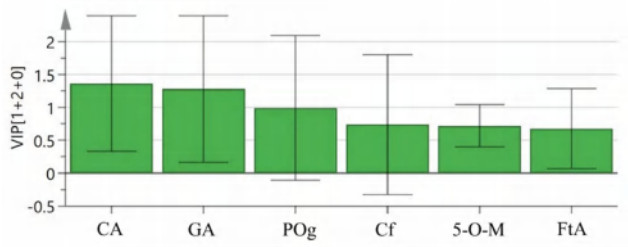


图 6 银花感冒颗粒的 VIP 图

Fig 6 VIP value diagram of Yinhua Ganmao granules

4 讨论

在流动相选择过程中，由于分析时间较长，导致 60 min 后出现的色谱峰有保留时间漂移的现象，通过调整流动相，将 A 相由纯有机相调整为含 0.1% 磷酸的 80% 乙腈溶液，可以有效解决峰保留时间漂移现象。在含量测定波长选择方面，从各对照品的光谱图可以发现，除 GA 的最大吸收在 251 nm 外，其余对照品的最大吸收均分布在 295 ～ 330 nm，经过比较分析，认为 300 nm 是适合采集指纹图谱进行分析的波长，该波长下图谱的整体效果、各色谱峰的分离表现、基线的稳定性等均能达到要求，因此选择 300 nm 作为主要分析波长，同时以 251 nm 作为 GA 的分析波长。

对不同厂家、相同厂家不同批次间含量测定结果进行对比，可以发现不同厂家间含量测定结果差异较为明显，说明不同厂家生产工艺的差异对药物物质基础有明显影响。通过 VIP 值筛选，CA 与 GA 为银花感冒颗粒的质量标志物成分，其主要来源为金银花和甘草，这与该药方“君臣佐使”的思路相吻合。本药方中金银花为“君药”，起到清热解毒，疏散风热的作用，归肺、胃经；甘草为方中“使药”，其意义一是引经药，二是调和药，同时发挥祛痰止咳，缓急止痛，调和诸药的功效。

5 结论

建立了银花感冒颗粒 HPLC 指纹图谱，共确定 15 个共有峰，并指认其中 6 个成分。10 批次银花感冒颗粒指纹图谱相似度在 0.95 以上，表明批间差异、各厂家间差异不大，各化学成分相对一致。含量测定结果表明，不同批次间各成分含量差异明显，说明不同批次的银花感冒颗粒所用原料药的质量可能存在差异，这些差异可能与药材产地、加工方法等有关。

在开展多元分析的过程中，以 6 种成分的含量测定结果为数据 *X* 矩阵，以样品分类为 *Y* 矩阵，充分考虑了数据差异的影响，进行了数据归一化，同时对构建的模型开展了置换验证，分析了各成分对模型影响的 VIP 值，确定了银花感冒颗粒的质量标志物，CA 与 GA 作为质量标志物，提示在进行银花感冒颗粒质量控制时，应重点关注金银花和甘草两味药材的投料及质量。

综上，本试验通过测定 10 批次不同厂家、不同批次的样品，得到各自的指纹图谱，利用指纹图谱技术对其展开分析，建立了银花感冒颗粒的指纹图谱方法，实现整体质量控制。同时，采用切换波长的方法实现了 6 种成分的同时测定。OPLS-DA 分析结果表明 CA 和 GA 可以作为银花感冒颗粒的质量标志物。综上，本研究建立的指纹图谱与多成分同时测定相结合的分析方法，简便、准确、重复性好、可操作性强，既考察了样品中多个指标性成分的含量，又考察了指纹图谱整体相似度，结合 OPLS-DA 分析方法，为银花感冒颗粒的质量研究提供科学依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部 . 中药成方制剂第二册 [M]. 北京：人民卫生出版社，1989.

[2] 胡小祥，何艳，刘冠琼，等 . HPLC 法同时测定银花感冒颗粒中 8 种成分 [J]. 中成药，2022，44（4）：1070-1074.

[3] 林晓，秦昌金，谢晓燕，等 . 银花感冒颗粒（无糖型）的成型制备工艺研究 [J]. 药学研究，2021，40（11）：735-738.

[4] 崔凯，贾朝，潘婷婷，等 . 无糖型银花感冒颗粒质量标准研究 [J]. 中医药导报，2020，26（4）：4-7，29.

[5] 倪文琳，汤瑜晨，韩玉涛，等 . 基于液相指纹图谱结合多成分含量测定的小儿肺热咳喘颗粒质量评价 [J]. 中南药学，2023，21（1）：203-207.

[6] 王帅，包永睿，李天娇，等 . 中药质量评价关键问题与分析方法探讨 [J]. 分析测试学报，2021，40（1）：132-138.

[7] 黄申，朱波，张巧艳，等 . 基于 UPLC 指纹图谱和黄酮醇苷含量的不同来源银杏叶的质量比较 [J]. 中草药，2022，53（13）：4125-4131.

[8] 孙昱，徐敢，马双成 . 中药质量整体评价研究思路探讨 [J]. 药学学报，2021，56（7）：1749-1756.

[9] 郭燕，孙岚萍，顾志荣，等 . 高效液相色谱指纹图谱结合一测多评法评价扶正救肺颗粒的质量 [J]. 中南药学，2022，20（10）：2385-2389.

[10] 周丽娟，杨晓宁，王雅芝，等 . 基于 HPLC-CAD 指纹图谱结合化学计量学方法分析不同产地北柴胡药材质量 [J]. 中南药学，2022，20（10）：2253-2258.

[11] 秦伟瀚，阳勇，刘翔，等 . 基于化学分析及药理毒理方法对马钱子炮制前后差异的实验研究 [J]. 药物分析杂志，2022，42（7）：1159-1169.

[12] 刘天亮，杨林林，董诚明，等 . 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药，2022，53（15）：4833-4843.

（收稿日期：2023-02-02；修回日期：2023-04-02）

基于近红外光谱及图像处理技术的中药化妆品保湿效果评价

郭金玲[1]，甄凯旋[1]，吴晨璐[1]，马盼盼[1]，胡雪婷[1]，赵静[1, 2*]（1. 天津中医药大学中药制药工程学院，天津 301617；2. 省部共建组分中药国家重点试验室，天津　301617）

摘要：目的　应用近红外光谱和图像处理技术对两种中药化妆品的保湿效果进行评价并提供选择依据。**方法**　选取黄芪保湿沁润精粹乳（样品 A）和茯苓亮肤菁华乳（样品 B）两种化妆品为研究对象，对 12 名志愿者右前臂内侧皮肤分别使用样品 A 和 B，使用后 30 min 对志愿者右前臂内侧皮肤进行肌肤检测仪检测，以及光谱数据和图像的采集。采用配对样本 *t* 检验，对使用样品 A、B 后右前臂内侧皮肤的纹理特征进行统计分析。**结果**　结合光谱预处理方法，分别建立使用两种化妆品后皮肤含水量定量分析模型，两模型的决定系数（R^2）分别为 0.8621 和 0.9462，预测均方根误差（RMSEP）分别为 4.8636 和 2.5713；对使用样品 A、B 后皮肤纹理特征的对比度和能量参数进行比较，发现两者差异有统计学意义（$P < 0.05$）。由光谱分析和图像分析结果发现，两种化妆品保湿效果之间差异有统计学意义，且样品 B 保湿性能优于样品 A。这与肌肤检测仪结果一致。**结论**　图像与光谱技术采用实时、无接触的方法对皮肤含水量进行测定，全面地从二维空间提供保湿评价，克服了生化评估方法对皮肤的损伤和视觉评估的主观性，为合理评价中药化妆品保湿功效提供依据。

关键词：近红外光谱技术；图像处理技术；中药保湿化妆品；皮肤含水量
中图分类号：R286.0　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1931-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.039

Moisturizing effect of traditional Chinese medicine cosmetics based on near-infrared spectroscopy and image processing technology

GUO Jin-ling[1], ZHEN Kai-xuan[1], WU Chen-lu[1], MA Pan-pan[1], HU Xue-ting[1], ZHAO Jing[1, 2*] (1. *School of Pharmaceutical Engineering*, *Tianjin University of Chinese Medicine*, *Tianjin*　301617; 2. *State Key Laboratory of Component Chinese Medicine Jointly Established by Province and Ministry*, *Tianjin*　301617)

Abstract: Objective　To evaluate the moisturizing effect of 2 traditional Chinese medicine cosmetics near-infrared spectroscopy and image processing technology. **Methods**　Astragalus hydrating essence milk (sample A) and Poria cocos bright skin essence milk (sample B) were selected as research objects. The two cosmetics were used on 12 volunteers' right forearm medial skin respectively. Then, these areas were detected by skin detector 30 minutes later and spectral data as well as images were collected. Paired sample *t* test was used to statistically analyze the skin texture features spectra of the right forearm medial skin after using sample A and B. **Results**　Combined with the spectral preprocessing method, models of skin moisture content after using cosmetics A and B were quantitative analyzed. The determination coefficients R^2 of the two models were 0.8621 and 0.9462, and the root mean square errors of prediction (RMSEP) were 4.8636 and 2.5713, respectively. Comparing the contrast and energy parameters of skin texture features after using sample A and B, significant differences was found between them ($P < 0.05$). According spectral analysis and image analysis, there were significant differences between the moisturizing effect of the two cosmetics, with the moisturizing performance of sample B better

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973699）。
作者简介：郭金玲，女，在读硕士研究生，主要从事中药质量分析技术方面的研究，email：guojl1006@163.com　*通信作者：赵静，女，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药质量分析技术方面的研究，email：cetty3190@163.com

than that of sample A, which was consistent with the result of the skin detector. **Conclusion** The image and spectrum technology can measure the skin moisture content in a real-time and non-contact way, and comprehensively evaluate moisturizing in a two-dimensional space, avoiding skin damage as in biochemical methods and subjectivity of visual evaluation.

Key words: near-infrared spectroscopy technology; image processing technology; traditional Chinese medicine moisturizing cosmetics; skin moisture content

保湿化妆品已成为当代人群的日常生活用品，随着人们护肤理念的提高，对其安全和功效要求也越来越高。但是我国化妆品功效性相关评价方案和标准尚未完善[1]，如何评定产品的保湿效果成为一项重要的工作。

目前，国内外相关领域研究人员主要通过在体法和体外法两个层面，对保湿化妆品的功效进行评价[2]。体外法包括物理化学法、细胞生物法、三维重组皮肤模型代替法等；在体法包括电导法、磁共振光谱法等，其中对化妆品领域中评估皮肤保湿效果以在体法为主[3]。在体法又可以分为直接测量法和间接测量法[4]。间接测量法是利用皮肤角质层的电生理特性进行测量，包括电导法、电容法、电阻法等，它是目前应用最为广泛的方法[5]。然而该技术是很容易受到皮肤中电解质的量和与皮肤接触面积的影响，缺乏灵敏度[6]。直接测量法包括拉曼光谱、衰减全反射光谱以及共聚焦拉曼显微镜等，可以对多个皮肤参数进行评估，但这些大型设备昂贵，在商业上难以应用[7]。近红外光谱法是由于水分子在近红外区有一些特征性很强的吸收带，且其他各种分子的倍频与合频吸收相对较弱，可以直接对皮肤中水分子进行检测[8]。该技术作为一种快速且无损的水分测量方法，许多研究已经使用它来研究皮肤水合作用和水分含量[9]。图像处理技术在采集图像时避免了探头压迫接触带来的负面影响，且可以根据需求选择足够大的分析区域，具有方便、形象直观等特点[10]。Wei 等[11]采用图像处理技术根据图像颜色和纹理特征进行了皮肤病识别。但该技术在应用阶段尚不完善，在评价过程中还需将图像分析方法与其他仪器测试技术联合使用。近红外光谱的穿透能力强，但是作为一种点测量方法，可以与图像处理技术相结合实现扩大检测深度与检测范围的目的。

本试验基于传统电学方法的检测结果作为参考，通过对近红外光谱不同特征值和图像纹理特征进行统计分析，采用近红外光谱技术和图像处理技术相结合的方法同时从皮肤表层和深层评价中药保湿化妆品对皮肤含水量的影响，为中药保湿化妆品的评价方法提供选择依据。

1 材料

1.1 仪器

M-6602 阿美妮肌肤检测仪（深圳市富恒通科技有限公司），AvaSpec-NIR512-1.7-HSC-EVO 便携式近红外光谱仪、AVALIGHT-HAL-S-MINI 光源（荷兰 Avantes 公司），光纤探头、EOS-800D 佳能数码单反相机（佳能有限公司），MASTER TL-D 90 Graphica 18W/965 标准光源灯管（荷兰 Philips 公司）。

1.2 样品

样品 A：黄芪保湿沁润精粹乳（广州喜华生物科技有限公司）；样品 B：茯苓亮肤菁华乳（广州喜华生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 受试者的选择

按照自愿原则，选择 12 名年龄在 18 ～ 25 岁、皮肤健康、表面无创伤、无化妆品过敏史的女性受试者。在试验前 24 h 之内试验区域不得使用其他同类保湿化妆品，且不得有日常清洁之外的皮肤护理行为。

2.2 条件与要求

在试验前，受试者需洗净右前臂内侧，晾干，测试前 30 min 受试者不得饮水、进食和激烈运动。在 20 ～ 25 ℃、相对湿度为 55% ～ 60% 的恒温恒湿室里至少稳定 30 min，待皮肤温度和湿度与环境达到平衡后，于右前臂内侧选取两块 4 cm×4 cm 的样本区，分为 A、B 区域，分别使用样品 A 和样品 B 进行涂抹。样品用量为（2.0±0.1）mg·cm^{-2}，均匀涂抹试验区域。测定标记区域样品使用前和 0、5、15、35、60、90、120 min 后各时间点皮肤含水量和近红外光谱并进行图像采集。

2.3 受试样品测定

2.3.1 皮肤含水量的测定　使用肌肤检测仪测定受试者右前臂内侧样本区使用样品前后的水分含量，每个测试点平行测定 3 次，取平均值，结果用百分含量表示。

2.3.2 近红外光谱的采集　受试者在使用前和使用后各时间段将右手伸进黑箱进行光谱采集，手臂保持水平与光源保持 1 cm 的距离，每个样本区

重复测量 3 次，取平均值。光谱扫描范围设置为 900 ～ 1700 nm，分辨率为 8.5 nm，扫描次数为 10 次，每个样品重复 3 次，计算平均光谱。

2.3.3　图像采集　使用三脚架将数码单反相机固定，保持镜头向下进行图像采集。在另一个提前搭建好的黑箱中固定标准光源灯管，黑箱上方开口保证相机可以拍摄到黑箱内部情况。在采集图像时，打开灯管，确保采集的图像光源稳定。受试者在使用前和使用后各时间段将右手伸进黑箱进行图像采集，相机焦距固定，拍照采用场景自动对焦模式，手臂保持水平，确保样本区在水平视野内，采集各个时间段图像一张，重复完成 12 名受试者的图像采集。采集设备均放置在暗箱中，装置图如图 1 所示。

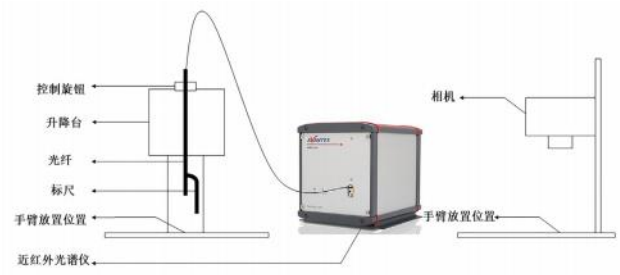


图 1　采集装置图

Fig 1　Acquisition device

2.4　近红外光谱数据处理

采用主成分分析方法，剔除异常样品光谱。使用光谱 - 理化值共生距离（sample set partitioning based on joint x-y distance，SPXY）算法将样本集进行划分。对近红外光谱进行预处理后，使用偏最小二乘法和蒙特卡洛交叉验证（Monte Carlo cross validation，MCCV）[12]，对训练集样品进行皮肤含水量预测模型的建立，并对预测模型进行验证。采用平滑、导数、标准归一化、多元散射校正、基线校正等光谱预处理方法，对模型进行优化。建模后根据评价参数对模型进行评价。决定系数（R^2）越大，预测集的均方根误差（root mean square error of prediction，RMSEP）越小，说明模型拟合效果越好，预测效果越好；R^2 越大，训练集的均方根误差（root mean square error of calibration，RMSEC）越小，说明模型拟合效果越好，模型越稳定。试验数据采用 MATLAB 2018a 软件（美国 MathWorks 公司）和 Origin 2021 软件（美国 OriginLab 公司）处理分析和作图。

2.5　皮肤图像纹理分析

选取受试者皮肤涂抹中心部位为皮肤原始图像，将其转换成灰度图像。采用直方图均衡化进行图像增强，二维自适应平滑滤波对灰度图像进行平滑。通过从不同角度（0°、45°、90° 及 135°）对皮肤纹理进行特征分析，确定其步距大小，提取皮肤图像纹理的灰度共生矩阵并计算它的能量、对比度、相关性及逆矩差来反映皮肤纹理的特征 [13]。通过提取它的特征值，进行保湿效果评价。

2.6　统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 26 软件（美国 IBM 公司）进行配对样本 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　基于肌肤检测仪的保湿效果比较

对 12 名受试者在使用样品前后各时间段的皮肤含水量重复测量 3 次，取平均值。图 2 为 120 min 内不同中药保湿乳对皮肤含水量的影响。本试验中，两种中药保湿乳均在 15 min 内快速蒸发，样品 B 相较于样品 A 蒸发更快。但在 15 min 之后两者均缓慢蒸发，使用样品 B 比使用样品 A 的皮肤含水量更高，保湿效果更好。

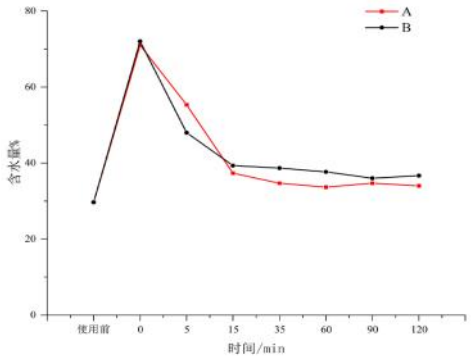


图 2　某一受试者 120 min 内不同保湿乳对皮肤含水量的影响

Fig 2　Influence of different moisturizers on skin water content within 120 min for a subject

3.2　近红外光谱模型评价及保湿效果比较

将采集得到的 84 条光谱建立光谱数学模型。通过对原始光谱数据采用一阶导数、二阶导数、S-G 平滑法（Savitzky-Golay）和标准正态变量变换（standard normal variate transformation，SNV）以及相结合的方法进行预处理，得到样品 A、B 经过各方法的预处理模型评价参数（见表 1）。综合参考模型评价参数，选择不作光谱预处理的近红外光谱数学模型。

采用 SPXY 算法按 7∶3 的比例对 84 条光谱进行分组，训练集含 59 条光谱，测试集含 25 条光谱。使用竞争性自适应重加权算法进行特征波长的获取并筛选。

筛选结果如图 3（a）和图 3（b）的灰色划线部分，A 模型共筛选出 51 个特征波段，B 模型共筛选出 48 个特征波段，两者特征波段主要集中在 960 ～ 1200 nm 和 1380 ～ 1700 nm 内。水分

表 1 样本 A、B 近红外光谱预处理模型评价参数

Tab 1 Evaluation parameters of the NIR preprocessing model for samples A and B

样品	预处理方法	最佳潜在变量（LV）	R^2	RMSEC	RMSEP
A	原始数据	12	0.8621	1.8767	4.8636
	一阶导数	12	0.7538	1.5394	4.5377
	二阶导数	12	0.7755	1.4002	5.1333
	S-G 平滑法	12	0.0260	12.1777	12.7238
	SNV 法	12	0.8497	1.8037	4.6546
	一阶＋ SCV	12	0.8217	1.2705	3.7429
	二阶＋ SCV	12	0.7831	1.2546	5.0804
B	原始数据	12	0.9462	1.3385	2.5713
	一阶导数	12	0.6670	0.9408	6.3336
	二阶导数	12	− 3.3562	1.8580	4.8161
	S-G 平滑法	12	− 0.0963	10.6070	14.0976
	SNV 法	12	0.7752	1.2013	2.7544
	一阶＋ SNV	12	0.8866	0.5569	2.4548
	二阶＋ SNV	12	0.8804	0.9496	3.9039

子在该范围内有一些特征性很强的吸收带，水的 O-H 合频引起在 960 nm 处的吸收，倍频引起的在 1150 nm、1450 nm 和 1790 nm 处的吸收。而其他分子的倍频与合频吸收相对较弱 [14]。故该特征选择方法与结果具有实际意义。

图 4 为受试者分别使用样品 A、B 后各时间段光谱波段与吸光度的关系。观察到两样品的吸收峰都在相同波段，水分子在 1220 nm 和 1450 nm 处显示出两个清晰的吸收峰，但 1450 nm 处水的吸光系数对于含水量达 50% ～ 60% 甚至更高的试样测定有效 [15]，故本试验选用 1220 nm 作为分析波长。

采用偏最小二乘法建立关于皮肤含水量的定量分析模型，模型的复杂度由 LV 控制，而最佳复杂度需要通过交叉验证进行估算，故采用 MCCV 对训练集数据进行重复 100 次的交叉验证。确定模型的 LV 数建立偏最小二乘法光谱数学模型。表 2 为样品 A、B 最佳光谱数据模型评价参数。

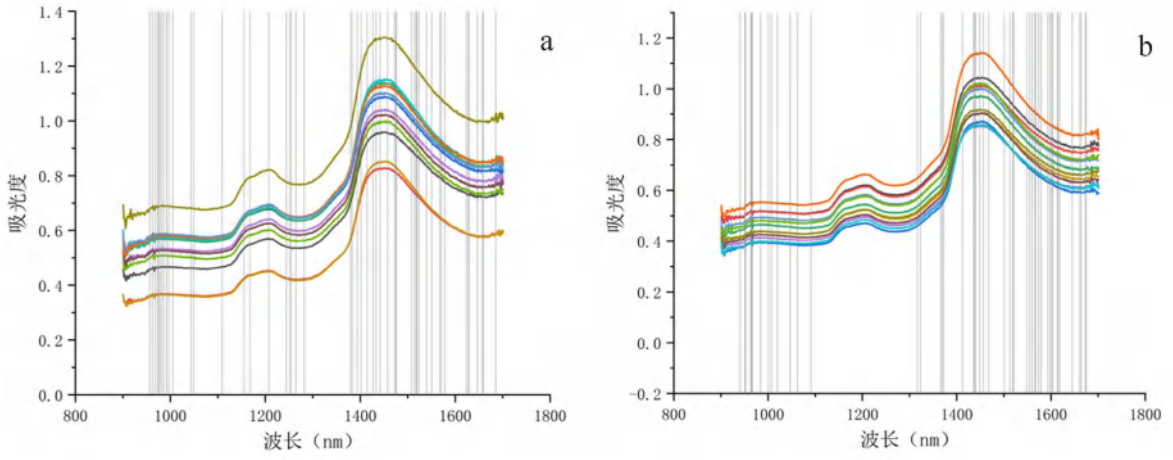


图 3 样品 A（a）和样品 B（b）的特征波长

Fig 3 Characteristic wavelengths of sample A（a）and sample B（b）

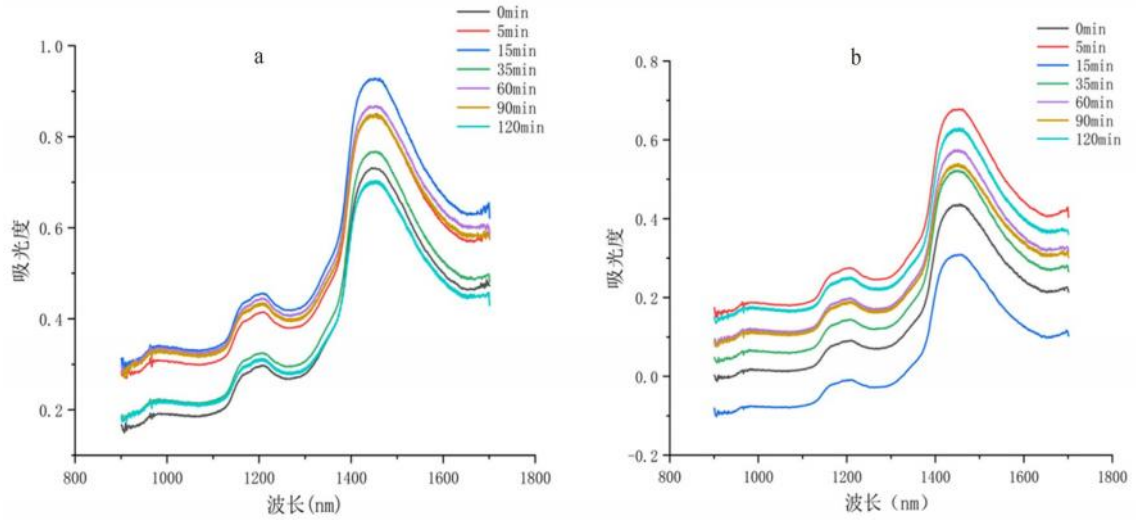


图 4 样品 A（a）、样品 B（b）各时间段光谱波段与吸收度的关系

Fig 4 Relationship between spectral bands and absorbance of sample A（a）and sample B（b）at each time period

由表 2 可知，样品 B 相较于样品 A 的模型拟合效果更好，预测效果更好，模型更稳定。

表 2　样品 A、B 最佳光谱数据模型评价参数

Tab 2　Evaluation parameters of the best spectral data model for sample A and B

样品	LV	R^2	RMSEC	RMSEP
A	12	0.8621	1.8767	4.8636
B	12	0.9462	1.3385	2.5713

3.3　图像纹理特征评价及保湿效果比较

直方图均衡化是一种图像增强方式，图像对比度较低，直方图会集中分布在比较小的灰度级，经过均衡化后，所有灰度范围相对频率相同，这样使得图像的熵最大，此时皮肤图像包含的信息量也是最大的。选择直方图均衡化作为预处理方式，经图像预处理后，图 5 为某一受试者处理前和处理后的图像效果。

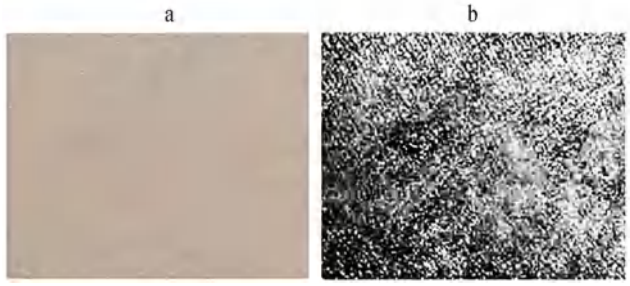


图 5　处理前（a）和处理后（b）的图像效果

Fig 5　Image effect before（a）and after（b）the treatment

通过对前述大量图像样本进行分析，对 4 个特征值（能量、对比度、相关性及逆矩差）进行提取。对比度反映了图像的清晰度和纹理的沟纹深浅。能量反映了图像灰度分布均匀程度和纹理粗细。在本研究中，通过对能量、对比度参数的分析，进而对皮肤纹理特征进行比较。受试者的手臂皮肤纹理基于灰度共生矩阵做步距 d ＝ 1，灰度级量化＝ 16，以观察样品 A、B 在各个时间段对 4 个方向 0°、45°、90° 及 135° 的对比度、能量、相关性、逆矩差平均值如表 3 所示。

表 4 为对比度和能量的统计学分析结果。对比度和能量经配对样本 t 检验可得样品 A 与样品 B 差值均具有统计学差异（$P < 0.05$），认为这两种保湿化妆品对人体皮肤纹理的对比度和能量有差别，且 95% 的置信区间分别为（－ 0.7399，－ 0.0904）和（0.0022，0.0117）。即样品 B 比样品 A 的对比度大，能量小。由表 5 可知，使用样品 B 后能量与皮肤含水量显著性相关（$P < 0.05$），说明使用样本 B 后纹理沟纹浅、皮肤纹理更均一，保湿效果更好。

4　讨论

黄芪多糖和茯苓多糖都具有极强的保湿吸湿性能。白及多糖分子中的多羟基和羧基结构，可以与水分子形成氢键来固定水分，其特殊的分子结构还能够将皮肤角质层与外界环境分隔，存留皮肤自身的水分 [16]。试验中发现样本 B 较样本 A 保湿性能更好，我们猜测是由于样本 B 含有白及和茯苓提取物这两种植物多糖，使得保湿功效增强，但具体原因及机制仍需讨论和后续试验验证。

肌肤测定仪直接测定皮肤含水量结果发现使用样品 B 比样品 A 的皮肤含水量高，保湿效果好。近红外光谱技术作为一种快速、非接触和非侵入性的技术，且穿透测量深度比基于电学的方法深得多 [17]，水在近红外光谱波段具有强的吸收峰，基于水的吸收特征，可以将近红外光谱技术用于水分含量的微小变化的检测 [18]。本试验中，近红外光谱特征波段的吸光度，在进行近红外光谱数学建模后，样品 A、B 数学模型的决定系数（R^2）分别为 0.8621 和 0.9462，表明样品 B 比样品 A 的保湿效果好，这与肌肤测定仪的结果相一致。对皮肤纹

表 3　灰度共生矩阵的对比度、能量、相关性、逆距差平均值

Tab 3　Average value of contrast，energy，correlation and inverse distance difference of co-occurrence matrix

特征值	样品	0 min	5 min	15 min	35 min	60 min	90 min	120 min
对比度	A	2.5291	2.6036	1.5449	3.8836	0.9896	1.3562	1.9578
	B	3.0481	2.9708	2.0902	3.6010	1.8460	1.6929	2.5216
能量	A	0.0421	0.0333	0.0450	0.0409	0.0494	0.0433	0.0448
	B	0.0296	0.0357	0.0376	0.0325	0.0385	0.0406	0.0357
相关性	A	0.7478	0.7395	0.8551	0.6378	0.9079	0.8665	0.8083
	B	0.6917	0.7278	0.7965	0.6653	0.8242	0.8436	0.7502
逆距差	A	0.7017	0.6336	0.7083	0.6127	0.7447	0.7076	0.6840
	B	0.6137	0.6258	0.6631	0.6039	0.6777	0.6848	0.6419

表 4　对比度和能量配对 t 检验统计结果

Tab 4　Statistical results of contrast paired and energy t-test

参数	样品	标准误差平均值	下限	上限	t	自由度	P
对比度	配对 A-B	0.1327	－ 0.7399	－ 0.0904	－ 3.1377	6	0.0204
能量	配对 A-B	0.0019	0.0022	0.0117	3.5704	6	0.0118

表 5 使用样品 A 和 B 后对比度、能量与皮肤含水量的相关性分析

Tab 5 Correlation analysis of contrast，energy and skin water content after using sample A and B

样品	参数	含水量	对比度	能量
A	含水量	1		
	对比度	0.229	1	
	能量	－0.157	－0.609	1
B	含水量	1		
	对比度	0.398	1	
	能量	－0.758*	－0.857*	1

注（Note）：与样品 A 比较，*$P < 0.05$（Compared with the sample A，*$P < 0.05$）。

理的科学评价是皮肤功效化妆品效能评估的重要手段[19]。图像处理技术通过灰度共生矩阵分析皮肤纹理特征信息，从而进行化妆品保湿功能的评价。图像处理技术的纹理特征中，样品 B 比样品 A 的对比度大，能量小。说明使用样本 B 后纹理沟纹浅、皮肤纹理更均一，保湿效果更好。这与肌肤测定仪测定含水量的结果相一致。从上述三个方面对中药保湿化妆品的保湿性能研究，均显示茯苓亮肤菁华乳的保湿性能优于黄芪保湿沁润精粹乳。

基于上述分析，本研究以基于电学方法的皮肤含水量检测结果为标准，同时将近红外光谱技术和图像处理技术用于皮肤含水量分析，从光谱和图像两个角度同时对同一受试者皮肤含水量进行统计学分析，进而评价两种中药化妆品的保湿效果。通过对比发现，两种方法均获得了与电学方法相同的评价结果，这证明了两种方法用于评价中药化妆品的保湿效果的有效性。与电学方法相比，近红外光穿透能力强，扩大了检测深度。图像处理技术可以多个位置同时测量，提高了检测效率。近红外光谱技术和图像处理技术均可以实现皮肤水分的非接触测量，具有准确、实时、无创的特点。随着保湿化妆品需求量的不断增加，与之相适应的保湿功效评价检测方法的发展也迫在眉睫。图像和光谱技术可以为化妆品保湿效果评估提供一种有效的检测手段，对于建立并完善化妆品功效评价体系方法有重要作用。

参考文献

[1] 丁梅华，程琳，赵华 .《化妆品监督管理条例》颁布背景下化妆品功效宣称的科学支持 [J]. 轻工学报，2021，36（5）：102-109，117.

[2] 王春晓，赵华 . 化妆品功效评价（Ⅱ）——保湿功效宣称的科学支持 [J]. 日用化学工业，2018，48（2）：67-72.

[3] 尹月煊，赵华 . 化妆品功效评价（Ⅰ）——化妆品功效宣称的科学支持 [J]. 日用化学工业，2018，48（1）：8-13.

[4] 华薇，李利 . 皮肤角质层含水量的电学法测量 [J]. 中国皮肤性病学杂志，2015，29（3）：314-317.

[5] Zhang SL，Meyers CL，Subramanyan K，et al. Near infrared imaging for measuring and visualizing skin hydration. A comparison with visual assessment and electrical methods [J]. J Biomed Opt，2005，10（3）：7-10.

[6] Kimoto A，Yonekawa F，Kawasoe T. Skin moisture measurement on stripping and pasted water by a handy-type electrostatic sensor [J]. Skin Res Technol，2022，28（2）：274-279.

[7] Mamouei M，Qassem M，Razban M，et al. Measurement of dermal water content using a multi-wavelength optical sensor [C]//Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc，2020，2020：4353-4356.

[8] 魏宇楠，黄兴国，曾敬其，等 . 中药大品种制造关键质量属性表征：水分含量化学属性的同仁牛黄清心丸 NIR 现场检测方法研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46（7）：1592-1597.

[9] Mamouei M，Chatterjee S，Razban M，et al. Design and analysis of a continuous and non-invasive multi-wavelength optical sensor for measurement of dermal water content [J]. Sensors，2021，21（6）：2162

[10] 李诚桐，赵华，王敏 . 化妆品功效评价（Ⅸ）——图像分析法在化妆品功效评价中的应用 [J]. 日用化学工业，2018，48（10）：551-557.

[11] Wei LS，Quan G，Ji T. Skin disease recognition method based on image color and texture features [J]. Comput Math Methods Med，2018，2018：1-10.

[12] Liang L，Wei LL，Fang GG，et al. Prediction of holocellulose and lignin content of pulp wood feedstock using near infrared spectroscopy and variable selection [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc，2020，225（117515）：1386-1425.

[13] 陈文睿，陈天华，王小艺，等 . 基于图像的皮肤纹理评价算法研究 [J]. 日用化学工业，2018，48（12）：695-701，710.

[14] 梁宏，金伟其，王霞 . 一种用于皮肤水分含量检测的短波红外光谱测量装置 [J]. 红外技术，2008，30（7）：416-420.

[15] 李民赞 . 光谱分析技术及其应用 [M]. 北京：科学出版社，2006：61-71.

[16] 祝贝贝 . 白及多糖分离纯化、化学性质及生物活性研究进展 [J]. 食品与发酵工业，2023，49（10）：343-350.

[17] Arimoto H，Egawa M. Imaging wavelength and light penetration depth for water content distribution measurement of skin [J]. Skin Res Technol，2014，21（1）：94-100.

[18] Egawa M，Yanai M，Maruyama N，et al. Visualization of water distribution in the facial epidermal layers of skin using high-sensitivity near-infrared（NIR）imaging [J]. Appl Spectrosc，2015，69（4）：481-487.

[19] Pang H，Chen TH，Wang XY，et al. Quantitative evaluation methods of skin condition based on texture feature parameters [J]. Saudi J of Biol Sci，2017，24（3）：514-518.

（收稿日期：2022-10-02；修回日期：2022-12-20）

医院药学

基于 SHEL ＋ Reason 模型的住院药房药品调剂差错安全风险综合评价指标体系的建立

闫岩[1]，吴小曼[1]，张青青[1]，李莹莹[1]，承华薇[2*]（1. 安徽省阜阳市第五人民医院药剂科，安徽　阜阳　236003；2. 中国科学技术大学附属第一医院药剂科，合肥　230001）

摘要：目的　建立基于 SHEL ＋ Reason 模型的住院药房药品调剂差错安全风险综合评价指标体系。**方法**　通过 SHEL ＋ Reason 模型对我院住院药房 2019 年 7—12 月期间的 441 076 条医嘱进行分析，结合文献复习法形成药品调剂差错安全风险的专家咨询表，采取德尔菲法（Delphi Method）进行咨询，通过统计学分析对指标体系进行完善，运用综合评分法构建综合评价方程，抽取 2021 年 1—6 月期间的 897 条调剂差错医嘱进行评价研究，采用信度分析验证指标体系的可靠性，对综合评价结果采用 $\overline{X}-\sigma_X$、$\overline{X}$、$\overline{X}+\sigma_X$ 确定区分不同等级的界限，进行单因素方差分析（完全随机设计），验证通过综合评价方法获得的各分类间的差异是否有统计学意义。**结果**　本指标体系包含 4 个一级指标，10 个二级指标，进行了两轮专家咨询后专家权威性和指标体系内部一致性良好，利用抽取的医嘱验证了构建的综合评价指标体系具有良好的区分度。**结论**　建立的住院药房药品调剂安全风险评价指标体系适用于医院住院药房的药品调剂差错管理，可为医院相关管理工作的开展提供参考。

关键词：SHEL ＋ Reason 模型；调剂差错；指标体系
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1937-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.040

Safety risk evaluation indicator system for drug dispensing errors in inpatient pharmacy based on SHEL+Reason model

YAN Yan[1], WU Xiao-man[1], ZHANG Qing-qing[1], LI Ying-ying[1], CHENG Hua-wei[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Fifth People's Hospital*, *Fuyang*　*Anhui*　236003; 2. *Department of Pharmacy*, *The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China*, *Hefei*　230001)

Abstract:Objective　To establish a safety risk evaluation indicator system for drug dispensing errors in inpatient pharmacy based on the SHEL+Reason model. **Methods**　The SHEL+Reason model was used to analyze 441 076 medical orders in inpatient pharmacy of our hospital from July to December 2019. Through with literature review, an expert consultation table of drug dispensing error safety risks was established. Delphi method was used for the consultation. The indicator system was improved by statistical analysis, and the comprehensive scoring method was used to construct comprehensive evaluation equation of extraction from January to June 2021. Totally 897 unreasonable orders were evaluated. The reliability of the indicator system was verified, and $\overline{X}-\sigma_X$, $\overline{X}$, and $\overline{X}+\sigma_X$ was used to distinguish the boundaries of different levels. A one-way analysis of variance (ANOVA) with a completely randomized design was used to verify the difference among the categories by the comprehensive evaluation. **Results**　The indicator system contained 4 first-level indicators and 10

基金项目：中国科学技术大学科“科大新医学”联合基金项目，中央高校基本科研业务费专项资金资助（No. WK9110000015）。
作者简介：闫岩，男，主管药师，主要从事药事管理学研究，email：ahcjdxhj@126.com　*通信作者：承华薇，女，硕士，主管药师，主要从事药事管理学及药物基因组学研究，email：aydchw@163.com

second-level indicators. After two rounds of experts consultation, experts authority and the internal consistency of the indicator system were good. The collected medical orders were used to verify the constructed comprehensive evaluation index system with good discrimination. **Conclusion** The drug dispensing risk indicator system helps manage the drug dispensing errors in hospital inpatient pharmacy, and provides reference for the development of hospital related management.

Key words: SHEL+Reason model; dispensing error; indicator system

住院药房是医院的重要组成部门，负责药品调剂、药品储存、药物咨询工作，面对患者多、工作量大，其药品管理质量对住院患者药物治疗效果有着直接的影响[1]。在住院药房管理的过程中，降低药品调剂差错率又是重中之重。药品调剂差错主要是指药房工作人员依据合理处方进行药品调剂时出现的差错，这类差错会影响医嘱的有效性，降低药物治疗效果，还会导致患者出现不良反应，甚至威胁生命。近年来，医院开始陆续关注住院药房管理的科学性、系统性、综合性，尝试在管理过程中采用科学模型进行分析[2-4]。

SHEL 模型起初在 1972 年被提出，后于 1975 年图表化[5]，该模型最初应用于航空业，探讨“人为因素”在航空不良事件中的作用[6]，在医学界应用不多，极个别研究将该模型运用在医疗事故的原因分析中，概括为软件、硬件、环境、人件，即 S、H、E、L，其中人件是 SHEL 模型的中心，其他配件须与之相匹配[7]。Reason 模型最早由 James Reason 提出[8]，后被广泛应用于航空业、核工业、医学等领域。Reason 模型中，事件的任何一个层面出现问题都将影响到整个事件的最终结果。这些层面层层叠加，正如一个有孔的奶酪，而不安全因素就像一个不间断的光源，能够透过奶酪上的空洞，在某种巧合下，空洞会排列在同一条直线上，光源可直接穿过，意外就发生了，所以 Reason 模型又称为瑞士奶酪模型[9]。自 1997 年，基于 Reason 模型有学者开始构建人的因素分析与分类系统（HFACS，Human Factors Analysis and Classification System）[10-11]，将组织中事故发生的原因分为了 4 个层面。SHEL 模型与 Reason 模型相互补充，有效提高了事故分析的科学性及综合性，有助于进一步优化医疗微环境，降低不良事件发生率[12-13]。在我国，类似模型已被应用于职业暴露的事故分析中，但以上两种模型联用于住院药房调剂差错的分析尚未见相关报道。

以往对住院药房药品调剂差错原因的研究，包含的指标不够全面，不能综合反映住院药房药品调剂差错安全风险的所有原因，另外在这些评价指标中，涉及药房调剂差错的各原因对于调剂差错的结果贡献是不一样的，有明显的指标权重差异，评价工作存在很大的局限性。为了使评价的结果更科学可信，要求对每一个评价指标赋予相应的权重系数。据文献检索，国内外尚未见有适用于住院药房药品调剂差错安全风险评价指标体系的报道，本研究通过运用 SHEL ＋ Reason 模型，结合文献复习法、德尔菲法（Delphi Method）、综合评分法，应用相关质量管理理论、数学模型理论、信息学理论等多种方法，定性定量地建立了一套科学系统的药品调剂差错安全风险评价指标体系，这在国内外尚属首次，可为解决住院药房药品调剂差错安全风险提供思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

根据医院信息系统（HIS）筛选出 2019 年 7—12 月的发药医嘱，采用自行设计的药品调剂差错本，收集已记录的药品调剂差错不良事件，按照医嘱条目逐条分析差错原因，作为评价指标拟订基础之一；另从 HIS 中调取 2021 年 1—6 月的发药医嘱。作为验证评价指标体系资料。

1.2 构建原则

建立住院药房药品调剂差错安全风险综合评价指标体系（以下简称体系），首先要对质量管理、医学综合评价、信息学理论基础等进行系统学习，同时明确药房调剂差错管理内涵，在体系的设计上遵循科学性、实用性、代表性及可操作性，选择的指标简单，同时体现层次性，尽可能全面地反映评价对象的总体情况，计算方法便于掌握。

1.3 研究方法

1.3.1 药品调剂差错原因的分析 依据 SHEL ＋ Reason 模型对 2019 年 7—12 月的药品调剂差错进行分析。首先，应用 SHEL 模型，分别从 S（软件）人员业务素质与能力、H（硬件）设备与工作场所、E（环境）工作环境、L（人件）当事人及他人 4 个方面进行分类；其次，采用由果及因的方式应用 Reason 模型对药品调剂差错原因进行分析（见图 1）。这种分析方法符合“光线穿透奶酪”逻辑，可从光线透出处回望来确定所有层次“奶酪”的漏洞[14-15]。

1.3.2 Delphi 修订评价标准 应用文献复习法结

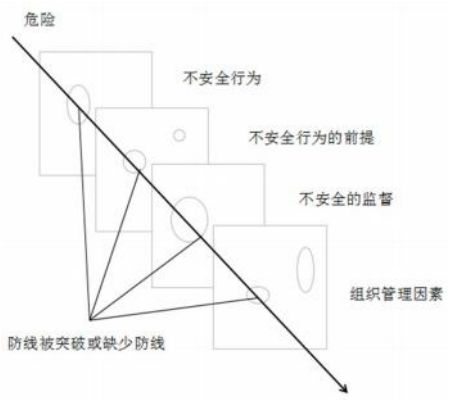


图 1　Reason 模型事故原因分析导图

Fig 1　Reason model analysis map for accident cause

合 SHEL ＋ Reason 模型的分析结果，初步拟订专家咨询表。本研究采用 Delphi 法，又名专家咨询法 [16]，专家不横向接触，匿名发表意见，课题组经过多轮次的征询、讨论，最后汇总成接近统一的评价结果。依照 Delphi 法的要求，我们邀请了全国的 20 名专家，涉及医院药事管理、管理学、统计学等相关领域，其中高级职称占 25%，副高级职称占 45%，中级职称占 30%；硕士占 65%，博士占 35%。将标准初稿设计成专家咨询表，向选定的专家进行两轮函询。采用 Likert5 分量表请每位专家就初拟指标逐条从有效性、安全性、实用性几个方面进行 1 ～ 5 分的评分，专家咨询问卷中问题设置采用此量表，即“很重要、重要、一般重要、不重要、很不重要”。收回的问卷进行数据分析时，对“很重要、重要、一般重要、不重要、很不重要”分别赋值“5、4、3、2、1 分”。并提出修改建议，课题组综合专家们的建议，采用相关统计学方法确定指标的选择是否可以用来降低住院药房调剂差错安全风险，以及是否便于实际操作。

1.3.3　Delphi 法的统计学分析　每轮咨询结束后根据 Likert5 分量表和分级量化表计算专家的判断系数（C_a）、熟悉程度（C_s）(具体量化值见表 1)，并以此计算权威程度系数（C_r），专家对全部指标的评价意见协调系数（ω，$0 \leqslant \omega \leqslant 1$），$\omega$ 值趋于 0，表明专家意见趋向分散，ω 值趋于 1，表明专家意见趋向统一，通过百分权重法计算各指标权重，并通过克朗巴赫系数（Cronbach’s alpha，α）[17] 来检验指标的内在一致性信度。克朗巴赫 α 系数的计算公式为：$\alpha = K/(K-1)(1-\sum S_i^2/S^2)$，$K$ 为整个调查表的条目数，S_i^2 为第 i 个条目得分的方差，S^2 为整个调查表得分的方差 [18]。

1.3.4　综合评分法构建综合评价方程　基于专家评价法衍生出的综合评分法是一种重要的综合评价方法，本课题采用该法构建住院药房调剂差错安全风险的综合评价方程。依据评价指标，对各指标制订以标准分值赋值的各评价等级，确定各指标权重，按照得出的总分确定综合评价总分值定义域，从而可以对各评价指标进行分析 [19]。采用百分权重法 [20] 计算各指标权重，因本次评价指标体系是由两个级别的指标构成，因此在考虑二级指标权重时，要考虑一级指标在所有评价指标中的权重分配，即组合权重。选取 2021 年 1—6 月期间的 897 条调剂差错医嘱，运用已建立的评价指标体系进行综合评价。

1.3.5　综合评分值等级划分及区分度检验　对综合评价结果采用 $\overline{X}-\sigma_X$、$\overline{X}$、$\overline{X}+\sigma_X$ 确定区分不同等级的界限，并采用完全随机设计的单因素方差分析来检验应用综合评价值获得的评价等级分类对住院药房药品调剂差错安全风险的区分度。

1.3.6　统计学分析　应用 SPSS 22.0 软件计算 Delphi 法相关分析指标，方差分析和相关性分析检验水准 $\alpha = 0.05$，所有的 P 值取双侧概率，最后将结果进行归一化处理计算各指标权重值。

表 1　专家对指标的判断依据及熟悉程度

Tab 1　Experts’ judgment basis and familiarity with indicators

判断系数（C_a）	量化值			熟悉程度（C_s）	量化值
	大	中	小		
理论分析	0.3	0.2	0.1	很熟悉	0.9
实践经验	0.5	0.4	0.3	熟悉	0.7
国内外同行的了解	0.1	0.1	0.1	较熟悉	0.5
直觉	0.1	0.1	0.1	一般	0.3
合计	1.0	0.8	0.6	较不熟悉	0.1
				很不熟悉	0.0

2　结果

2.1　SHEL ＋ Reason 模型分析结果

根据 SHEL ＋ Reason 模型的分析要求，住院药房药品调剂差错问题可归纳为以下 4 点：

① 不安全行为包括操作流程不当及调剂错误：药房工作人员操作流程不当，未执行“四查十对”等操作规范等，发药人员对于药品的名称、剂型、规格、用法用量混淆导致调剂差错。② 不安全行为的前提包含主客观原因，主观原因为调剂药师错拿、漏拿药品，审方药师未仔细核对药品，护士未对药品进行再次核对等；客观原因为临床科室多，工作环境嘈杂，工作强度大，患者及临床科室护士领药时一起堆积在发药窗口，发药设施设备跟不上住院药房的高强度，如 HIS 卡顿，导致医嘱未按照顺序显示，或打印机卡纸等。③ 不安全的监督分为药房人员的相互监督、药房部门负责人对于药房人员的监督、及所有人员间的互相监督，是否制订了相应的工作制度、

操作规范等，同时也包含监督不充分、监督违规等。④ 组织管理因素，虽不直接但却关键，其对整个药品调剂差错原因体系起到画龙点睛的作用，包括资源管理、组织氛围和运作过程[21]。

我们对以上问题，按照 SHEL 模型的归因分析，2019 年 7—12 月调剂医嘱条目共 441 076 例，其中药品调剂差错医嘱条目 1681 例，工作环境差错影响因素占比最高，其次是设备与工作场所差错，再次是人员业务素质与能力及当事人和他人差错影响因素。2021 年 1—6 月调剂医嘱条目共 427 172 例，出现药品调剂差错 897 例，原因分析，结果显示 S、E 的原因差错比例均有下降，H、L 差错问题依然有待进一步改进，见表 2。

表 2 药品调剂差错原因模型归类分析

Tab 2 Classification and analysis of drug dispensing errors cause model

原因归类	2019 年 7—12 月			2021 年 1—6 月		
	差错医嘱（*n*）	占总差错比 /%	差错率 /%	差错医嘱（*n*）	占总差错比 /%	差错率 /%
人员业务素质与能力（S）	372	22.13	0.084	192	21.40	0.045
设备与工作场所（H）	510	30.34	0.116	278	30.99	0.065
工作环境（E）	521	30.99	0.118	256	28.54	0.060
当事人及他人（L）	283	16.84	0.064	171	19.06	0.040
总计	1681	100.00	0.380	897	100.00	0.210

2.2 Delphi 法研究结果

2.2.1 指标体系组成 运用 Delphi 法对初拟指标进行补充修改，得出一级指标 4 个，二级指标 10 个，具体见表 3 及 4。

2.2.2 专家咨询结果 本研究共发放了专家咨询问卷 40 份，收回 38 份，总回收率为 95%，有效问卷 37 份，总的有效率为 97.37%。专家咨询的可靠性由专家积极系数，专家意见集中程度（见表 3、4），专家的权威程度（见表 5）及专家意见协调系数（见表 6）进行验证，结果显示，专家对指标的评判意见达到了协调一致。

表 3 两轮专家咨询后的一级指标统计描述

Tab 3 Statistical description of first-level indicators after two rounds of experts consultation

一级指标	第一轮结果		第二轮结果	
	均数	标准差	均数	标准差
S	4.841	0.328	4.683	0.436
H	4.757	0.625	4.581	0.765
E	4.569	0.596	4.325	0.657
L	4.266	0.387	4.597	0.572

2.2.3 最终指标及其权重 经过两轮 Delphi 法专家咨询后，最终确立了指标体系及各指标相应权重，具体见表 7 及 8。

2.2.4 指标体系综合评价研究 2021 年 1—6 月的 897 例调剂差错医嘱的评价结果运用已建立的综合评价模型进行验证，得分的基本情况：平均分：34.23，标准差：3.68，得分最低为 20.55，最高为 40.17。

2.2.5 综合评价值等级分类及区分度检验 对综合评价结果采用 $\overline{X}-\sigma_X$、$\overline{X}$、$\overline{X}+\sigma_X$ 法确定区分不同等级的界限，根据综合评分的结果分为 4 个等级：0 ～ 30.50 分为重度不合理，30.50 ～ 34.19 分为中度不合理，34.19 ～ 37.86 分为轻度不合理，37.86 分以上为合理。综合评价的结果显示不合理率为 99.11%，与前述所抽取的 897 例医嘱为调

表 4 两轮专家咨询后的二级指标统计描述

Tab 4 Statistical description of second-level indicators after two rounds of experts consultation

二级指标	第一轮		第二轮	
	均数	方差	均数	方差
S1 完善工作制度、规范操作流程	4.251	1.407	4.332	0.577
S2 加强人员的业务能力培训	4.775	0.983	4.552	0.569
S3 质控小组定期质控检查	4.462	0.735	4.211	0.624
H1 应用信息化和多媒体平台技术	4.110	1.266	4.256	0.900
H2 引进单剂量自动药品分装机等硬件设备	4.235	0.697	4.232	0.688
E1 优化工作环境	4.642	0.559	4.335	0.458
E2 合理配置人员	3.755	0.967	3.823	0.526
L1 加强调剂药师责任心培养	3.113	0.875	2.843	0.473
L2 加强调剂药师与临床的沟通	3.528	0.685	3.697	0.523
L3 加强调剂药师与患者及家属的沟通	3.267	0.535	3.598	0.577

表 5 两轮咨询专家权威程度

Tab 5 Authority degree of experts in two rounds of consultation

咨询轮数	判断系数（C_a）	熟悉程度（C_s）	权威程度（C_r）
第一轮	0.82	0.73	0.84
第二轮	0.91	0.85	0.77

表 6 两轮专家意见的协调程度及其 χ^2 检验

Tab 6 Coordination degree of two rounds of experts opinions and Chi-square test

指标	第一轮			第二轮		
	ω	χ^2	P	ω	χ^2	P
一级指标	0.38	31.96	0.000	0.466	34.96	＜ 0.001
二级指标	0.253	176.99	0.000	0.416	218.61	＜ 0.001

表 7　一级指标的权重

Tab 7　Weights of first-level indicators

指标编号	指标	评价得分	权重
S	人员业务素质与能力	4.69	0.2735
H	设备与工作场所	4.45	0.2143
E	工作环境	4.63	0.2697
L	当事人及他人	3.56	0.2425

表 8　二级指标的权重及组合权重

Tab 8　Weights and combined weights of second-level indicators

指标编号	二级指标	第二轮		
		平均值	权重	组合权重
S1	完善工作制度、规范操作流程	4.67	0.4305	0.1177
S2	加强人员的业务能力培训	4.62	0.4695	0.1284
S3	质控小组定期质控检查	4.22	0.1000	0.0274
H1	应用信息化和多媒体平台技术	4.57	0.6925	0.1484
H2	引进单剂量自动药品分装机等硬件设备	4.41	0.3075	0.0659
E1	优化工作环境	4.33	0.6253	0.1686
E2	合理配置人员	4.21	0.3747	0.1011
L1	加强调剂药师责任心培养	3.77	0.3265	0.0792
L2	加强调剂药师与临床的沟通	4.21	0.3751	0.0910
L3	加强调剂药师与患者及家属的沟通	3.63	0.2984	0.0724

剂差错这一结论一致。通过单因素方差分析得，$F = 436.175$，$P = 0.0004$，表明各等级分类之间差异有统计学意义；各等级分类之间进行两两比较，各组之间的 P 值均＜ 0.05，评价等级之间差异有统计学意义，综合评价等级分类对住院药房药品调剂差错安全风险评价具有较好的区分度。

2.2.6　信度分析　利用已建立的体系对抽取的医嘱条目进行调查研究，得到信度评价的结果：α 系数为 0.736，折半信度 R 为 0.923。体现了指标间具有良好的一致性 [22]。

3　讨论

3.1　SHEL ＋ Reason 模型影响因素分析

运用 SHEL ＋ Reason 模型对住院药房药品调剂差错安全风险进行分析评估有助于保证医疗质量安全，这是一项大胆的尝试。在高强度的住院药房药品调剂工作中，工作人员因业务不熟、工作态度敷衍等造成误拿相似的不同厂家、不同名称、不同制剂规格的药品，如将磷酸奥司他韦胶囊（75 mg/10 袋）错拿为磷酸奥司他韦颗粒（15 mg/10 袋），或是漏拿了药品。相似药品在货架上摆放位置较近，药品外包装破损导致误拿，打印机卡纸致医嘱打印不清晰，医嘱打印不完整等 [23]。对于某些长期医嘱，由于 HIS 中未对患者长临医嘱药品进行统一规划，导致调剂人员发药错误，出现重复给药或药品漏发。在此次 SHEL 分析中占最主要原因的是住院药房的工作环境，我院住院患者及陪护人员相对较多，环境嘈杂，药房调剂人员及审方人员人手不足，可能会进一步降低药品调剂准确性。药师审方不细致，护理人员、患者、家属拿药时未再仔细核对药品，住院药房借调调剂人员等。Reason 模型从 4 个大方向，以整体视角对药房调剂差错原因进行分析，对 SHEL 模型的分析进行补充归纳。

3.2　针对存在问题采取相应防范措施

针对具体原因，我们制订了调剂药师及审方药师的规范化培训手册，巩固重要的药学理论知识，强化调剂审方需要遵循的基本原则，并定期考核；同时对所有住院药房工作人员进行药品调剂风险教育，加强相关的调剂差错法律知识补充，根据药房工作强度进行弹性排班，在高峰期合理增加轮岗人员。我们在 HIS 中区分了长期和临时医嘱，药品货架上进一步明确易混淆药品、高警示药品、新进品种品规药品等警示牌，对毒性药品、麻醉药品、精神药品明确专人专柜，责任到人；同时优化窗口，设置专药专窗发放，设置特殊管理药品调配专岗，提高特殊药品处方集中审核和管理力度，同时根据药品分类、发药频率，优化药品摆放位置，遵循排列整齐、排放规范、常用药品 “快识快找” 原则，减少药师无效跑动。定期检查并统计名称、包装相似或同品名不同厂家的药品，同时，做好药房硬件设施更新，如增加重点易错药品柜，更换工作电脑主机、更换空调等，提升医院工作环境。在人员方面，分为药剂人员和医护患两大方面，药剂方面，逐步完善工作管理制度，加强药品发放管理，严格要求药品调剂人员做好 “四查十对”，对于退回药品应重视检查工作，明确退药手续是否齐全，在依照药品目录将其放入药架时，需再次检查药品外包装、有效期是否合乎规范。积极做好审方培训，制订《药房质量控制标准》《处方审核制度》等，帮助药房人员提高个人责任意识，并落实处方审核工作，减少超剂量用药、配伍禁忌等发生率。对院内取药护士、实习生等进行规章制度学习、培训，明确取药流程，张贴告示牌，告知取药注意事项。对药师进行沟通技巧学习培训，帮助药房人员分析取药患者医务人员心理特征、情绪特点，通过学习并掌握一定话术，提高其沟通能力，在日常工作中也能及时与医护人员展开沟通，说明一些药物使用、库存情况，提高医师医嘱制订的正确性。

3.3 住院药房药品调剂差错安全风险评价指标的建立

住院药房药品调剂差错问题一直是医院药学工作者关注的问题[24]，此前也有部分研究，甚至采用了数学模型对调剂差错问题进行了分析总结，如李志伟[25]应用 SHEL ＋ Reason 模型对信息系统人为因素进行了风险评价，构建了一套多层次、多角度人因导致信息差错风险的评价指标体系。刘志勤[26]将 Reason 模型结合 PDCA 循环管理法应用到临床风险管控中，有效减少了医疗不良事件的发生。以上研究从不同侧面、不同程度分析了调剂差错问题，但对于具体的评价指标，至今没有统一标准，造成了各研究的相对独立、分散，不易形成管理规范，且每一项可能影响因素对总体原因的贡献是不一样的，原则上应对各个评价指标赋以相应的权重系数。通过两轮专家咨询，本体系建立了 4 个一级指标和 10 个二级指标，设计直观，可操作性好，包含指标能够反映住院药房药品调剂差错安全风险，适用于医院药房药品调剂安全性管理及考评。在结合专家意见基础上，合并了部分指标，针对所有指标，专家的协调系数接近 0.5，全部专家对指标的评判意见较为一致，P 值均小于 0.05，本研究考虑到了指标的综合权重，以定量考评药品调剂差错的安全性，最后采取了综合评分法构建了综合评价模型，并对建立的综合评价指标体系进行了实证研究，采用 $\overline{X}-\sigma_X$、$\overline{X}$、$\overline{X}+\sigma_X$ 对综合评价结果进行分级，对分级结果采用方差分析验证等级分类的区分度，结果证明了建立的综合评价体系是科学可行的。本研究所选取的资料来自于一家综合性医院，可能数据比较单薄，不够全面，对于指标的不合理选项可能较为集中，其数据分析结果的说服力会有所减弱。下一步将通过选取更多医院的医嘱对药品调剂安全性风险进行评价，在更大范围内验证所建立指标体系的科学性和可靠性。综上，SHEL ＋ Reason 模型在住院药房药品调剂差错风险管理上可以起到积极的作用，巩固药品调剂安全防御系统，更好地服务于患者，服务于临床。

参考文献

[1] 李丽娟，胡冰，毛艳 . SHEL 模型在护理不良事件安全管理中的应用 [J]. 世界最新医学信息文摘，2020，20（70）：352-353.

[2] 叶红，钱荣，张华 . 基于 M-SHEL 模型的住院老人安全用药风险评价指标体系 [J]. 牡丹江医学院学报，2019，40（2）：117-119.

[3] 毛琴，吴学芳，王丽敏 . SHEL 护理模型在小儿门诊输液中的应用 [J]. 齐鲁护理杂志，2021，27（19）：98-100.

[4] 雷云，王涛 . 探讨新型冠状病毒肺炎疫情下捐赠药品的规范化管理模式 [J]. 中南药学，2020，18（10）：1721-1725.

[5] 李媛 . SHEL 模型解读 [J]. 山东医药，2013（45）：96-97.

[6] 李海峰，张卫华，武喜萍 . 人因工程在民航事故分析中的应用现况 [J]. 人类工效学，2009，15（1）：56-59，63.

[7] Chang YH，Yeh CH. Human performance in air traffic control [J]. Appl Ergon，2010，41（1）：123-129.

[8] James R. Human error [M]. London：Cambridge University Press，1990.

[9] 李萌 . 浅谈在 Reason 模型中设置风险屏障的困难与挑战 [J]. 大连海事大学，2009，35（7）：79-81.

[10] 维格曼，夏佩尔 [美]. 飞行事故人的失误分析 [M]. 马锐译 . 北京：中国民航出版社，2006：88-94.

[11] 霍志勤，谢孜楠 . Reason 模型在空中交通管制中的应用 [J]. 中国安全科学学报，2008，18（1）：154-159.

[12] 鲁志卉，王颖，郭晓贝，等 . 护理不良事件原因分析模型研究进展 [J]. 护理学杂志，2019，34（21）：107-110.

[13] 陈娟娟，王松，张岩飞，等 . SHEL 模型在降低住院药房药品调剂差错中的应用 [J]. 中国医药导刊，2021，23（3）：231-234.

[14] 韩慧 . 护理不良事件的理论分析与管理策略探讨 [D]. 太原：山西医科大学，2013.

[15] 耿增显，赵嶷飞，孟令航，等 . 基于 Reason 模型的航空器事故调查分析软件设计 [J]. 中国民航大学学报，2013，31（3）：6-10.

[16] 孙振球 . 医学综合评价方法与应用 [M]. 北京：化学工业出版社，2006：29-56.

[17] 郝元涛，孙希凤，方积乾，等 . 量表条目筛选的统计学方法研究 [J]. 中国卫生统计，2004，21（4）：209-211.

[18] 承华薇，史天陆，朱鹏里，等 . 重组人胰岛素药物利用评价标准的建立 [J]. 中国药房，2014，25（8）：701-704.

[19] 姜芳晶，杨维中 . 医学常用综合评价方法 [J]. 疾病监测，2006，21（6）：325-328.

[20] 王欣，杨美玲，张进，等 . 百分权重法在护理质量管理中的应用 [J]. 护理研究，2010，24（5）：1195-1196.

[21] 阚庭，李娟，师文文，等 . 基于 Reason 模型给药错误不良个案分析 [J]. 解放军医院管理杂志，2015，22（8）：782-785.

[22] 闫宇翔，许娟，刘佑琴 . 亚健康状态评价问卷的拟定及其信度、效度检验 [J]. 中华流行病学杂志，2009，30（6）：579-582.

[23] 杨文月，李晓利，李倩，等 . 应用 Wichens 认知模型分析住院药房调剂差错与改进 [J]. 中国药业，2019，28（19）：89-91.

[24] 谭活玲，黄洋扬 . 门诊西药房药品调剂差错的防范措施 [J]. 中国药物经济学，2014，9（6）：18-19.

[25] 李志伟 . 信息系统风险评估及风险管理对策研究 [D]. 北京：北京交通大学，2010.

[26] 刘志勤 . “瑞士奶酪模型”用于临床风险管控 [J]. 医院院长论坛，2013（5）：25-32.

（收稿日期：2022-10-18；修回日期：2022-12-06）

氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重有效性和安全性的 Meta 分析

陈仕鹏，曹利娟，李凌松，刘代华*（广西医科大学附属柳州市人民医院药学部，广西　柳州　545005）

摘要：目的　系统评价氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重（AECOPD）的疗效和安全性，为临床合理用药使用提供循证医学证据。**方法**　系统检索 CBM、CNKI、VIP、WanFang、PubMed、Embase、Web of Science、The Cochrane Library、ClinicalTrials 数据库，收集氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗对比氨溴索单药治疗 AECOPD 的随机对照试验（RCTs），检索时间从建库至 2022 年 11 月。将检索的文献由 2 位评价员独立筛选文献、提取资料和评价质量，采用 RveMan 5.4 进行 Meta 分析。**结果**　共纳入 17 篇 RCT，收集到 1454 例患者，所纳入的文献质量较低。Meta 分析结果显示，与单用氨溴索治疗相比，氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 能显著提高总有效率 [RR ＝ 1.24，95%*CI*（1.18，1.30），*P* ＜ 0.000 01]、一秒用力呼气容积（FEV1）/用力肺活量（FVC）[MD ＝ 5.92，95%*CI*（4.95，6.88），*P* ＜ 0.000 01]、FEV1 [MD ＝ 0.29，95%*CI*（0.23，0.34），*P* ＜ 0.000 01] 及氧分压水平 [MD ＝ 11.88，95%*CI*（8.78，14.98），*P* ＜ 0.000 01]，降低二氧化碳分压 [MD ＝－ 9.38，95%*CI*（－ 10.78，－ 7.99），*P* ＜ 0.000 01]、C 反应蛋白（CRP）水平 [CRP ≥ 50 mg • L^{-1}，MD ＝－ 11.34，95%*CI*（－ 13.11，－ 9.56），*P* ＜ 0.000 01；CRP ≤ 50 mg • L^{-1}，MD ＝－ 3.54，95%*CI*（－ 4.62，－ 2.46），*P* ＜ 0.0001]。两组不良反应发生率无显著差异 [RR ＝ 0.69，95%*CI*（0.44，1.10），*P* ＝ 0.12]。**结论**　相比氨溴索单药治疗，氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 的有效率较高，不良反应发生率轻微。但受文献质量和数量的影响，还需进行多中心、大样本、高质量的 RCTs 进行验证。

关键词：氨溴索；乙酰半胱氨酸；慢性阻塞性肺疾病急性加重；Meta 分析；随机对照试验
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)07-1943-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.041

Meta-analysis of the effectiveness and safety of ambroxol combined with acetylcysteine for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease

CHEN Shi-peng, CAO Li-juan, LI Ling-song, LIU Dai-hua* (*Department of Pharmacy*, *Liuzhou People's Hospital Affiliated to Guangxi Medical University*, *Liuzhou*　*Guangxi*　545005)

Abstract: Objective　To systematically evaluate the effectiveness and safety of ambroxol combined with acetylcysteine for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD), and provide evidence for rational use of drugs. **Methods**　CBM, CNKI, VIP, WanFang, PubMed, Embase, Web of Science, The Cochrane Library, and ClinicalTrials databases were searched for relevant randomized controlled trials (RCTs) of ambroxol combined with acetylcysteine verse ambroxol monotherapy for AECOPD from the inception of the databases to November 2022. All the retrieved papers were screened, and evaluated by two independently researchers, followed by meta-analysis by Rev Man 5.4. **Results**　Totally 17 RCTs were included, involving 1454 patients. The quality of the included research was low. The meta-analysis showed that ambroxol combined with acetylcysteine for AECOPD significantly

基金项目：白求恩医学科学研究基金资助项目（No. SCZ286DS）；广西壮族自治区中医药管理局科研项目（No. GZZC2020381）；广西壮族自治区卫生健康委员会科研项目（No. Z20200224）。
作者简介：陈仕鹏，男，主管药师，主要从事呼吸内科临床药理学研究，email：lllccsp@163.com　*通信作者：刘代华，女，主任药师，主要从事临床药理学研究，email：38353828@qq.com

increased the total effective rate [RR ＝ 1.24, 95%*CI* (1.18, 1.30), *P* ＜ 0.000 01], the value of forced expiratory volume in one second (FEV1)/ forced vital capacity (FVC) [MD ＝ 5.92, 95%*CI* (4.95, 6.88), *P* ＜ 0.000 01]; FEV1 value [MD ＝ 0.29, 95%*CI* (0.23, 0.34), *P* ＜ 0.000 01], and the oxygen partial pressure level [MD ＝ 11.88, 95%*CI* (8.78, 14.98), *P* ＜ 0.000 01]. The reduced carbon dioxide partial pressure [MD ＝ － 9.38, 95%*CI* (－ 10.78, － 7.99), *P* ＜ 0.000 01] and C-reactive protein (CRP) levels [for CRP ≥ 50 mg • L^{-1} group, MD ＝ － 11.34, 95%*CI* (－ 13.11, － 9.56), *P* ＜ 0.000 01; for CRP ≤ 50 mg • L^{-1} group, MD ＝ － 3.54, 95%*CI* (－ 4.62, － 2.46), *P* ＜ 0.0001] as compared with ambroxol monotherapy. There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups [RR ＝ 0.69, 95%*CI* (0.44, 1.10), *P* ＝ 0.12]. **Conclusion** Compared with ambroxol monotherapy, ambroxol combined with acetylcysteine is more effective for AECOPD, and the incidence of adverse reactions is light. However, due to the quality and quantity of literatures, multi-center and high-quality RCTs with large sample sizes are needed for verification.

Key words: ambroxol; acetylcysteine; acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; meta-analysis; randomized controlled trial

慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）是世界范围内发病率和病死率最高的五大疾病之一。COPD 的特点是长期呼吸道症状和气流受限，主要症状包括呼吸急促和咳嗽，并可能产生黏液 [1]。慢性阻塞性肺疾病急性加重（acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease，AECOPD）是 COPD 症状的突然恶化，包括呼吸急促、咳嗽加剧、痰量增多或痰液呈脓性，超出日常的变异，导致需要改变药物治疗 [2]。气道黏液高分泌是 COPD 的重要临床表现之一，其与 COPD 的临床结局密切相关。研究表明，慢性黏液高分泌与 COPD 患者一秒用力呼气容积（FEV1）的加速下降和住院时间的增加明显相关，祛痰治疗有助于减轻气道的炎症反应和缓解患者的症状 [3-4]。

氨溴索是一种黏液溶解剂，可促进肺表面活性物质的分泌，降低痰液黏度，促进呼吸道分泌物排出 [5]。乙酰半胱氨酸（*N*-Acety-*L*-Cysteine，NAC）是一种强效的化痰类药物，可通过破坏黏蛋白中的二硫键降低黏液黏稠度，改善黏液纤毛清除功能，增加呼吸道分泌、稀释痰液，促进呼吸道分泌物的加速排出，同时也具有抗氧化和抗炎特性，能够有效清除机体内的氧自由基 [6-7]。目前多项研究报道氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 疗效较好，且不良反应少，但各研究样本量较小、质量不高，所得结论参考价值有限。因此本文旨在系统评价氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 的疗效和安全性，为氨溴索和乙酰半胱氨酸的联合治疗提供循证医学证据和决策参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

以“Pulmonary Disease，Chronic Obstructive”“AECOPD”“Ambroxol”“Acetylcysteine”“Mucosolvan”“Fluimucil”“randomized controlled trial”等为检索词检索 PubMed、Embase、Web of Science、The Cochrane Library、ClinicalTrials 外文数据库。以“肺疾病，慢性阻塞性”“慢阻肺急性加重”“氨溴索”“沐舒坦”“乙酰半胱氨酸”“富露施”“随机对照试验”“RCT”等为主题词或关键词系统检索中国生物医学文献数据库（CBM）、中国知网（CNKI）、VIP 数据库及万方数据库。各个数据库检索时间范围均从建库至 2022 年 11 月。

1.2 文献纳入与排除标准

1.2.1 研究类型 随机对照试验（RCT）。

1.2.2 诊断标准 患者均符合《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》（2021 年修订版）中关于 COPD 的诊断标准且临床表现均符合《慢性阻塞性肺疾病急性加重（AECOPD）诊治中国专家共识》（2017 年更新版）[8-9]。排除：有严重心肝肾疾病的患者；存在恶性肿瘤及全身系统性疾病的患者；合并有肺结核、肺栓塞、心律失常、心力衰竭、胸腔积液等疾病的患者；半个月内使用过免疫抑制剂治疗者；对本研究中所用的药物过敏的患者；中途退出的患者。

1.2.3 干预措施 对照组采用氨溴索治疗联合常规治疗（包括吸氧、纠正酸碱平衡及水电解质平衡、止咳平喘等），试验组在对照组的治疗方案上加用乙酰半胱氨酸治疗。各研究中氨溴索及乙酰半胱氨酸的剂量见表 1。

表 1　纳入研究的基本信息

Tab 1　Basic characteristics of included studies

文献	例数（T/C）	男 / 女		年龄 / 岁		干预措施		疗程	结局指标
		T	C	T	C	T	C		
保瑜 [10] 2020	41/41	25/16	23/18	73.2±2.46	72.9±2.28	C＋a	氨溴索注射液 30 mg qd ivgtt	4 周	①②
曾贤鑫 [11] 2020	27/27	12/15	13/14	71.4±4.90	72.6±5.50	C＋b	氨溴索片 60 mg tid po	2 周	①②③
顾联斌 [12] 2017	42/42	28/14	29/13	68.5±4.92	68.5±4.85	C＋b	氨溴索注射液 60 mg qd ivgtt	2 周	①②③④
井泉 [13] 2019	40/40	25/15	24/16	71.5±5.82	71.3±5.94	C＋b	氨溴索注射液 60 mg qd ivgtt	2 周	①②③④
王怡进 [14] 2021	28/28	16/12	15/13	70.3±6.36	70.5±6.42	C＋b	氨溴索分散片 30 mg qid po	2 周	①
杨妍 [15] 2016	23/24	17/6	19/5	70.5±1.34	70.1±5.74	C＋b	氨溴索片 60 mg tid po	2 周	②
邹玲玲 [16] 2019	41/41	25/16	24/17	66.2±3.44	65.8±3.21	C＋b	氨溴索片 60 mg tid po	2 周	①②
伊孙邦 [17] 2019	58/58	38/20	35/23	58.4±8.41	59.1±8.67	C＋d	氨溴索注射液 15 mg tid 雾化吸入＋异丙托溴铵 0.5 mg tid 雾化吸入	7 d	①②
殷晓娜 [18] 2020	30/30	18/12	20/10	71.7±14.09	73.3±10.13	C＋e	氨溴索注射液 15 mg biw 支气管肺泡灌洗	2 周	③④
张海涛 [19] 2017	55/51	32/23	29/22	63.4±12.20	65.0±9.70	C＋b	氨溴索片 60 mg tid po	6 月	①
赵萌 [20] 2006	75/75	45/30	46/29	67.0±9.00	68.0±8.00	C＋b	氨溴索片 60 mg tid po	7 d	①⑤
朱志刚 [21] 2020	52/52	32/20	30/22	70.5±6.48	71.4±5.47	C＋b	氨溴索注射液 15 mg tid ivgtt	2 周	①②④⑤
郭红敏 [22] 2017	37/37	20/17	21/16	73.7±4.10	73.5±4.30	C＋b	氨溴索片 60 mg tid po	2 周	②⑤
陈莉 [23] 2021	26/26	19/7	20/6	72.6±6.35	71.2±6.80	C＋a	氨溴索口服液 30 mg bid po	10 d	①②③⑤
王岳宸 [24] 2021	63/62	41/22	42/20	66.20±5.08	65.71±4.92	C＋b	氨溴索片 60 mg tid po	3 月	①②⑤
杨凤 [25] 2022	31/31	17/14	18/13	73.59±6.32	73.31±6.57	C＋b	氨溴索注射液 60 mg qd ivgtt	10 d	①③④
杨娴梅 [26] 2021	60/60	46/14	48/12	70.02±3.36	69.56±3.64	C＋f	氨溴索注射液 30 mg bid ivgtt	15 d	①③④⑤

注：a. 吸入用 NAC 溶液 0.3 g bid 雾化吸入；b. NAC 片 0.6 g bid po；d. 吸入用 NAC 溶液 0.3 g tid 雾化吸入；e. 吸入用 NAC 溶液 0.3 g biw 支气管肺泡灌洗；f. NAC 颗粒 0.2 g tid po. T. 实验组；C. 对照组；① 有效率；② 肺功能；③ CRP 水平；④ 血气；⑤ 不良反应发生率。

Note：a. acetylcysteine solution for inhalation，0.3 g，bid，aerosol inhalation；b. acetylcysteine tablets，0.6 g，bid，po；d. acetylcysteine solution for inhalation，0.3 g，tid，aerosol inhalation；e. acetylcysteine solution for inhalation，0.3 g，biw，bronchoalveolar lavage；f. acetylcysteine granules，0.2 g，tid，po. T. the experimental group；C. the control group；① effective rate；② pulmonary function；③ c-reactive protein value；④ arterial blood gas analysis；⑤ adverse effects rate.

1.2.4　结局指标　疗效指标为总有效率、治疗后 FEV1/FVC 水平、治疗后 FEV1 水平、治疗后氧分压，治疗后二氧化碳分压水平及治疗后 CRP 水平。安全性指标为不良反应发生率。参照《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》（2021 年修订版）相关标准评估两组患者疗效。

1.2.5　排除标准　① 非中、英文文献；② 仅有摘要，无法获取全文的文献；③ 对重复发表或有雷同的文献，仅保留最先发表的一篇，对同一研究多次发表的情况，仅保留样本量最大和信息最全的一篇；④ 数据不完整或有错误。

1.3　文献质量评价和信息提取

按照 Cochrane 偏倚风险 2.0（RoB2.0）工具评估 RCT 的偏倚风险 [27]，由 2 位评价者独立进行评价，评价内容包括：随机序列生成和分配隐藏方法、研究者和受试者施盲、研究结局盲法评价、数据完整性、报告偏倚和其他偏倚。检索到的所有文献由 2 位评价员独立筛选和资料提取，不一致的地方由第 3 位评价者进行仲裁。使用 Excel 建立数据提取表格。提取内容包括第一作者及发表时间、样本量、性别、年龄、病程、干预措施、结局测量指标、文献质量情况。

1.4　数据整理与统计分析

采用 RevMan 5.4 软件进行分析，连续性变量采用均数差（MD）作为效应量，二分类变量采用相对危险度（RR）作为效应量，各效应量分别给出 95%*CI* 估计。各纳入结果之间的异质性用 c^2 检验。若各研究间无异质性（$P > 0.1$，$I^2 < 50\%$），采用固定效应模型；反之，使用 Stata 14.0 分析异质性来源，若异质程度在可接受范围内且找不到异质性原因，使用随机效应模型合并效应量；若找到异质性原因，对导致异质性的因素进行亚组分析。使用 RevMan 5.4 绘制漏斗图并通过 Stata 14.0 进行 Egger 检验判断其发表偏倚。

2　Meta 分析结果

2.1　纳入研究的一般特征

初始检索出相关文献 84 篇，剔除重复文献后为 41 篇；剔除 Meta 分析、系统评价和综述后得 34 篇文献；通过阅读文献题目、摘要后获得文献 22 篇；通过阅读全文，排除不符合纳入标准或试验设计标准文献后，最终纳入 17 篇 [10-26]。共纳入 1454 例患者，纳入研究的基本信息见表 1。纳入的 17 个试验均在中国进行，其中试验组 729 例，对照组 725 例，最小样本量为 23 例，最大样本量为 75 例。

2.2　纳入研究质量评价

纳入的 17 项研究中，16 项采用随机数字表

法进行分组，1 项研究未报道随机分配方法[16]。17 项研究未提及分配隐藏。12 项研究未对患者、试验人员以及对结局评估者实施盲法，其余 5 项研究未提及是否使用盲法[12, 14-16, 20]。所有纳入研究的文献质量较低（见图 1）。

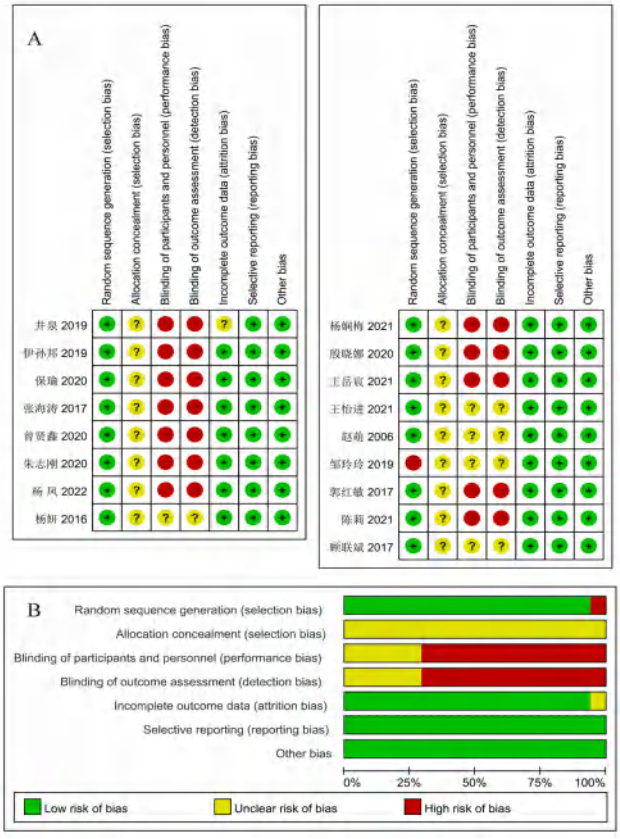


图 1 纳入研究质量评价

Fig 1 Quality evaluation of included studies

A. 偏倚风险图（risk of bias graph）；B. 偏倚风险总结图（risk of bias summary）

2.3 Meta 分析结果

2.3.1 总有效率 共纳入 14 项研究，1273 例患者报道了总有效例数，经过异质性检验，各研究间无显著的异质性（$P = 0.72$，$I^2 = 0\%$），采用固定效应模型合并效应量并分析，结果见图 2。Meta 分析结果显示氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 总有效率显著高于单独使用氨溴索治疗组 [RR = 1.24，95%*CI*（1.18，1.30），$P < 0.000\,01$]。

2.3.2 治疗后 FEV1/FVC 水平 共纳入 11 项研究，900 例患者报道了 FEV1/FVC 水平，两组的基线无差异，可进行后续的 Meta 分析。经过异质性检验，$I^2 = 44\%$ 且 $P < 0.05$，提示本次研究选择的文献之间存在异质性。采用 Meta 回归未寻找到异质性产生原因，采用随机效应模型合并效应量并分析。结果显示与单用氨溴索相比，氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 显著提高 FEV1/FVC 值 [MD = 5.92，95%*CI*（4.95，6.88），$P < 0.000\,01$]，见图 3。

2.3.3 治疗后 FEV1 水平 共纳入 5 项研究，414 例患者报道了 FEV1 水平，两组基线差异无显著意义（$P = 0.94$，$I^2 = 0\%$），可进行后续的 Meta 分析。经过异质性检验，各研究间无显著异质性（$P = 0.24$，$I^2 = 27\%$），采用固定效应模型合并效应量并分析，结果与对照组相比，试验组显著提高 FEV1 值 [MD = 0.29，95%*CI*（0.23，0.34），$P < 0.000\,01$]，见图 4。

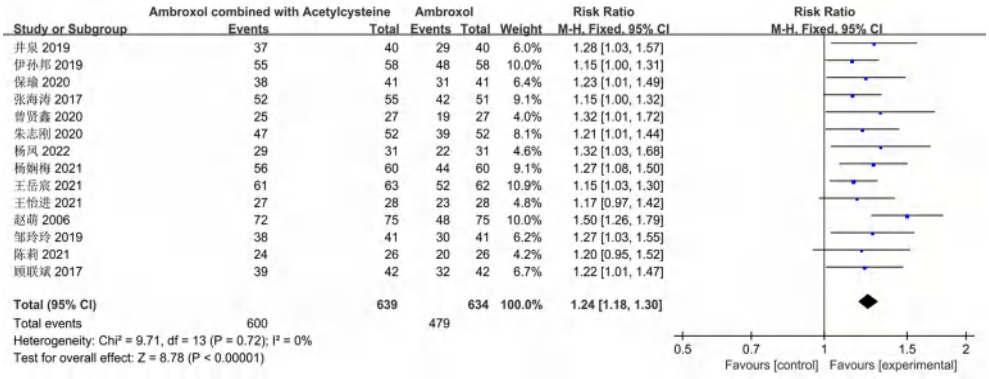


图 2 两组患者治疗后总有效率 Meta 分析

Fig 2 Meta-analysis of total effective rate of two groups of patients after the treatment

2.3.4 治疗后氧分压水平 共纳入 6 项研究，510 例患者报道了氧分压水平，两组间氧分压的基线期差值无异质性和显著性（$P = 0.95$，$I^2 = 0\%$），可进行后续的 Meta 分析。经过异质性检验（$I^2 = 66\%$ 且 $P < 0.05$），提示本次文献之间存在异质性。进一步按照对照措施将研究分为手术给药组（肺泡灌洗术给药）和非手术组（静脉及口服给药），以组别变量为协变量进行 Meta 回归寻找异质性产生原因，结果显示对照措施间无显著性的差异（$P = 0.09 > 0.05$）。未找到异质性原因，且文献间为中度异质，采用随机效应模型合并效应量并分析，结果显示与对照组相比，试验组显著提高氧分压 [MD = 11.88，95%*CI*（8.78，14.98），$P < 0.000\,01$]，见图 5。

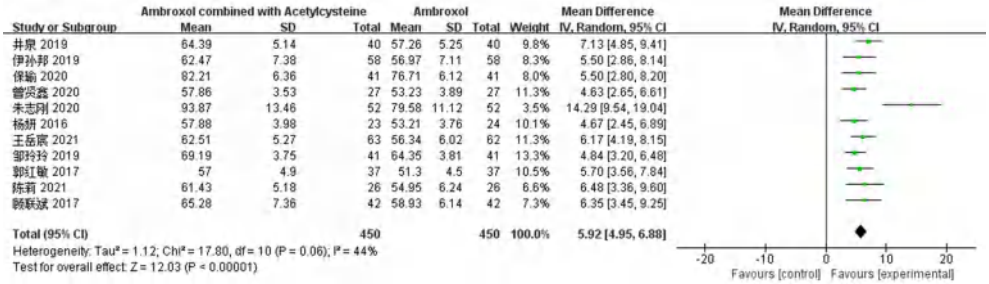


图 3　两组患者治疗后 FEV1/FVC 水平的 Meta 分析

Fig 3　Meta-analysis of FEV1/FVC in two groups after the treatment

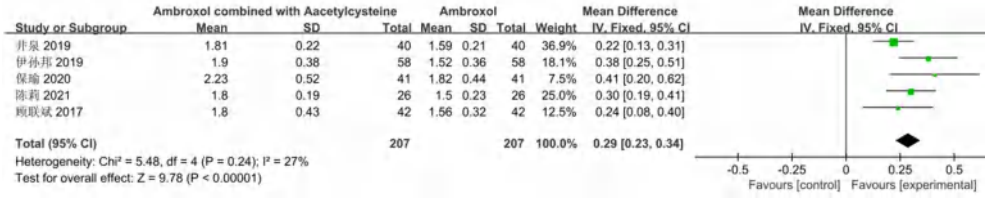


图 4　两组患者治疗后 FEV1 水平的 Meta 分析

Fig 4　Meta-analysis of FEV1 in two groups after the treatment

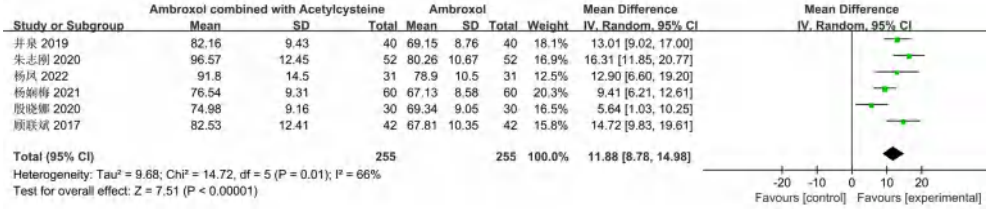


图 5　两组患者治疗后氧分压水平的 Meta 分析

Fig 5　Meta-analysis of oxygen partial pressure in two groups after the treatment

2.3.5　治疗后二氧化碳分压　共纳入 6 项研究，510 例患者报道了二氧化碳分压值，两组间二氧化碳的基线期差值无异质性且无显著性（P = 0.96，I^2 = 0%），可进行后续的 Meta 分析。经过异质性检验，I^2 = 81% 且 P < 0.05，提示本次研究选择的文献之间异质性具有统计学意义。进一步采用 Meta 回归寻找异质性产生原因。按照对照措施将研究分为手术给药组和非手术组，以组别变量为协变量进行 Meta 回归，结果显示对照措施间有显著差异（P = 0.015）。由于只有一篇研究采用手术给药，排除该研究后剩余 5 项研究，共 450 例患者的二氧化碳分压值纳入 Meta 分析，经过异质性检验，各研究间无显著的异质性（P = 0.33，I^2 = 14%），采用固定效应模型合并效应量并分析，结果显示与对照组相比，显著降低二氧化碳分压 [MD = − 9.38，95%*CI*（− 10.78，− 7.99），P < 0.000 01]，见图 6。

2.3.6　治疗后 CRP 水平　共纳入 7 项研究，512 例患者报道了 CRP 水平，两组间 CRP 的基线期差值无异质性且无显著性（P = 0.95，I^2 = 0%），可进行后续的 Meta 分析。经过异质性检验，I^2 = 94% 且 P < 0.000 01，提示本次研究选择的文献之间异质性具有统计学意义。进一步采用 Meta 回归寻找异质性产生原因。按照治疗前 CRP 水平将研究分为高 CRP 组（CRP ≥ 50 mg • L^{-1}）和低 CRP 组（CRP ≤ 50 mg • L^{-1}），以组变量为协变量进行 Meta 回归，结果显示初始治疗的 CRP 水平为异质性来源（P = 0.029 < 0.05），建议按照治疗前 CRP 水平高低进行亚组 Meta 分析。高 CRP 组间有轻度的异质性（P = 0.11，I^2 = 47%），采用随机效应模型合并效应量并分析，结果显示对于治疗前高 CRP（CRP ≥ 50 mg•L^{-1}）的 AECOPD 患者，与对照组相比，试验组能显著降低 CRP[MD = − 11.34，95%*CI*（− 13.11，− 9.56），P < 0.000 01]。低 CRP 组间无异质性（P = 0.52，I^2 = 0%），采用固定效应模型合并效应量并分析，结果显示对于治疗前低 CRP（CRP ≤ 50 mg • L^{-1}）的 AECOPD 患者，与对照组相比，试验组显著降低 CRP [MD = − 3.54，95%*CI*（− 4.62，− 2.46），P < 0.0001]，见图 7。

2.3.7　不良反应发生率　共纳入 6 项研究，625 名患者报道了不良反应发生情况，各研究见无显著的异质性（P = 0.49，I^2 = 0%），采用固定效应模型合并效应量并进行分析。结果显示试验组不良反应发生率与治疗组无显著差异 [RR = 0.69，95%*CI*（0.44，1.10），P = 0.12]，见图 8。

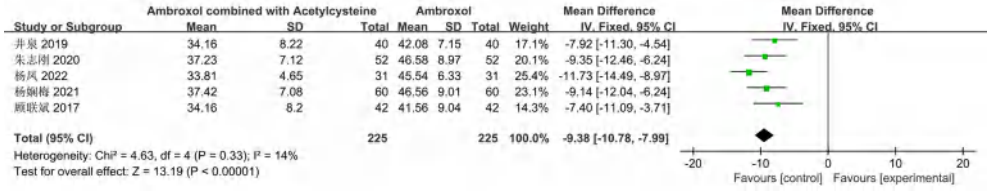


图 6 两组患者治疗后二氧化碳分压水平的 Meta 分析

Fig 6 Meta-analysis of carbon dioxide partial pressure in two groups after the treatment

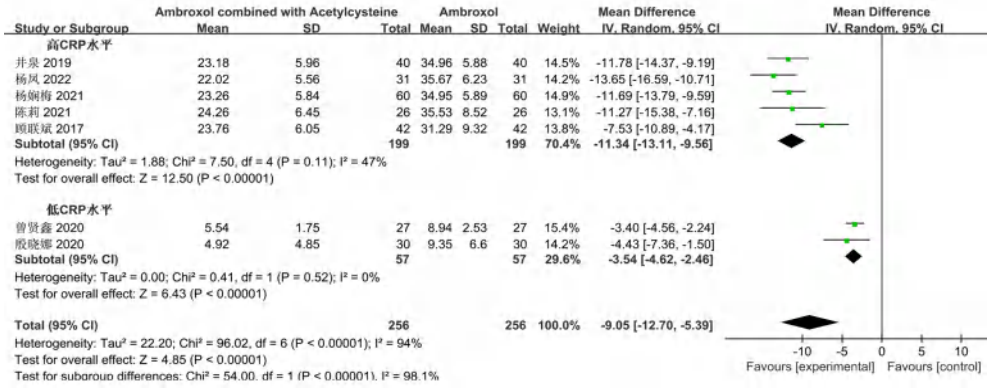


图 7 两组患者治疗后 CRP 水平的 Meta 分析

Fig 7 Meta-analysis of CRP level in two groups after the treatment

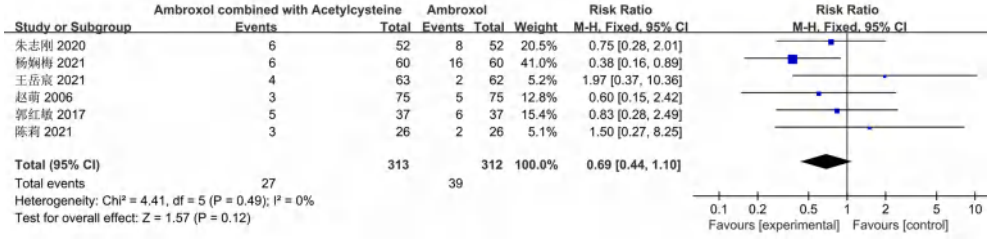


图 8 两组患者不良反应发生率 Meta 分析

Fig 8 Meta-analysis of the incidence of adverse reactions in the two groups

2.4 发表偏倚分析

通过绘制漏斗图对主要结局指标总有效率纳入文献是否存在偏倚进行考察，结果漏斗图对称（Egger's test 得出 $P = 0.07$），见图 9，说明无发表偏倚。

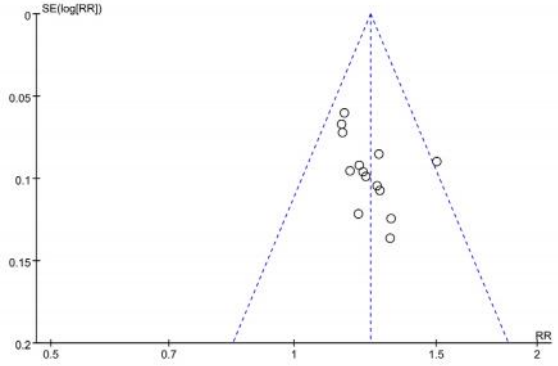


图 9 总有效率纳入研究的偏倚分析

Fig 9 Bias analysis of total effective rate

3 讨论

3.1 纳入研究质量分析

本研究纳入的 RCT 质量普遍较低，主要存在以下几方面的问题：① 纳入的 17 项研究样本量较少，缺乏多中心的 RCT 研究；② 纳入的 17 项研究中仅 1 项未报道随机分配方法 [16]，12 项明确提出未使用盲法，其余 5 项 [12, 14-16, 20] 未提及是否使用盲法，造成了一定的测量偏倚；③ 纳入研究在治疗后二氧化碳分压水平指标中存在明显的异质性，这可能是由于纳入的 1 项研究 [18] 的给药方式为肺泡灌洗，每周 2 次给药，与其他 3 项研究给药方式不同；④ 本研究未限制氨溴索及乙酰半胱氨酸的给药剂型，这可能也是造成异质性的原因之一；⑤ 由于各项研究结局指标具有多样化，有少量研究测定其他的结局指标，目前尚不能完全提取全部相关的数据。⑥ 尚缺乏大样本、多结局指标的临床研究。

3.2 疗效分析

Meta 分析结果显示，使用氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗的 AECOPD 患者总有效率、FEV1/FVC 水平、FEV1 水平、氧分压水平均高于单独使用氨溴索患者；治疗后二氧化碳分压水平、CRP 水平均低于单独使用氨溴索患者。因此，氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 临床效果

好，具有一定的协同作用。

3.3 安全性分析

纳入的 17 项研究中，6 项研究[20-24，26]报道了联用氨溴索和乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 后出现的不良反应，但症状较轻且发生率较低，与单独使用氨溴索治疗相比，无显著性差异。提示两种药物联用安全性较高。

3.4 小结

就现有证据而言，氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 具有一定的优势，但本系统评价纳入的研究质量不高，建议对氨溴索联合乙酰半胱氨酸治疗 AECOPD 的 RCT 应进行更严格的试验设计和指标测定。

参考文献

[1] Lin VY，Kaza N，Birket SE，et al. Excess mucus viscosity and airway dehydration impact COPD airway clearance [J]. Eur Respir J，2020，55（1）：1900419.

[2] 蔡柏蔷，陈荣昌 . 慢性阻塞性肺疾病急性加重（AECOPD）诊治中国专家共识（2017 年更新版）[J]. 国际呼吸杂志，2017，37（14）：1041-1057.

[3] Liang C，Mao X，Niu H，et al. Characteristics，management and in-hospital clinical outcomes among inpatients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in China：results from the phase I data of ACURE study [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis，2021，16：451-465.

[4] 马红玲，徐兵，李昕，等 . 1 例慢性阻塞性肺疾病患者的药学监护 [J]. 中南药学，2015，13（6）：657-659.

[5] 窦国朝 . 氨溴索的药理作用及临床应用研究新进展 [J]. 中国处方药，2017，15（5）：22-23.

[6] Tenório M，Graciliano NG，Moura FA，et al. *N*-acetylcysteine（NAC）：impacts on human health [J]. Antioxidants（Basel），2021，10（6）：967

[7] 杨中澜，王敏，周莉莉，等 . 乙酰半胱氨酸的药理作用与临床应用 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（14）：1932-1936.

[8] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组，中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会 . 慢性阻塞性肺疾病诊治指南（2021 年修订版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2021，44（3）：170-205.

[9] 慢性阻塞性肺疾病急性加重（AECOPD）诊治专家组 . 慢性阻塞性肺疾病急性加重（AECOPD）诊治中国专家共识（2017 年更新版）[J]. 国际呼吸杂志，2017，37（14）：1041-1057.

[10] 保瑜 . 乙酰半胱氨酸联合氨溴索对老年 AECOPD 患者肺功能及血清 SOD、MDA 水平的影响 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志，2020，4（3）：15-16.

[11] 曾贤鑫 . *N*- 乙酰半胱氨酸联合氨溴索治疗老年 AECOPD 患者的效果及对氧化应激的影响 [J]. 中国医学创新，2020，17（5）：9-12.

[12] 顾联斌，朱怡 . 乙酰半胱氨酸联合氨溴索治疗老年慢性阻塞性肺病急性发作期的临床研究 [J]. 现代药物与临床，2017，32（4）：636-639.

[13] 井泉 . 乙酰半胱氨酸联合氨溴索治疗老年慢性阻塞性肺病急性发作期的临床价值分析 [J]. 医学理论与实践，2019，32（8）：1161-1162.

[14] 王怡进，秦国平，徐家顺 . 探讨乙酰半胱氨酸联合氨溴索治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性发作期的临床价值 [J]. 哈尔滨医药，2021，41（1）：27-28.

[15] 杨妍，房宇 . *N*- 乙酰半胱氨酸联合氨溴索对老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者氧化应激的影响 [J]. 实用老年医学，2016，30（5）：406-408.

[16] 邹玲玲 . *N*- 乙酰半胱氨酸与氨溴索联合用药治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床疗效及其对患者氧化应激的影响 [J]. 吉林医学，2019，40（12）：2810-2811.

[17] 伊孙邦 . 联用盐酸氨溴索、乙酰半胱氨酸和异丙托溴铵治疗 AECOPD 的效果观察 [J]. 当代医药论丛，2019，17（18）：133-134.

[18] 殷晓娜，杨万春 . 乙酰半胱氨酸联合盐酸氨溴索支气管肺泡灌洗对 AECOPD 的疗效 [J]. 中国医药导刊，2020，22（6）：389-392.

[19] 张海涛，张映铭，王彩英，等 . 盐酸氨溴索联合 *N*- 乙酰半胱氨酸对慢性阻塞性肺病患者血清胸腺基质淋巴生成素和嗜酸粒细胞阳离子蛋白的影响 [J]. 海军医学杂志，2017，38（6）：513-516.

[20] 赵萌，王立芹，杨福堂，等 . 富露施治疗慢性阻塞性肺病急性加重期的疗效观察 [J]. 实用医技杂志，2006，13（18）：3262-3263.

[21] 朱志刚 . 乙酰半胱氨酸联合氨溴索治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性发作期的效果 [J]. 中国医药指南，2020，18（13）：71-72.

[22] 郭红敏，刘文焕，张淑云 . *N*- 乙酰半胱氨酸联合氨溴索在老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期治疗中的应用探讨 [J]. 中国保健营养，2017，27（1）：334-335.

[23] 陈莉 . 氨溴索与乙酰半胱氨酸联合治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性发作期的临床疗效 [J]. 慢性病学杂志，2021，22（6）：905-907.

[24] 王岳宸 . 盐酸氨溴索联合 *N*- 乙酰半胱氨酸治疗老年 COPD 的效果及对患者血清 VAP-1、SFRP-1、ECP 水平的影响 [J]. 医学信息，2021，34（10）：110-112.

[25] 杨凤，谢玉芳，黄小红 . 乙酰半胱氨酸＋氨溴索治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性发作期的临床应用效果探讨 [J]. 中国现代医生，2022，60（1）：66-68.

[26] 杨娴梅，李献荣，冷萍 . 采用乙酰半胱氨酸与氨溴索联合治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作期的价值分析 [J]. 大医生，2021，6（6）：47-49.

[27] Cumpston M，Li T，Page MJ，et al. Updated guidance for trusted systematic reviews：a new edition of the cochrane handbook for systematic reviews of interventions [J]. Cochrane Database Syst Rev，2019，10：Ed000142.

（收稿日期：2022-10-24；修回日期：2022-03-03）

品管圈在降低高警示药品管理不合格率中的应用研究

路支超，赵如森，徐洪燕，张霞，王雷*（淄博市市立医院，山东 淄博 255400）

摘要：目的 探讨品管圈在降低高警示药品管理不合格率中的作用。**方法** 我院药学部于 2021 年成立品管圈，确定以“降低高警示药品管理不合格率”为主题，发动头脑风暴，利用鱼骨图、“二八”法则等分析导致高警示药品管理不合格的真因，提出对策并实施，比较运用品管圈活动前后高警示药品管理不合格率的变化。**结果** 现状把握阶段，找出本次品管圈活动的改善重点为标识混乱、存放地点不对、存放数目与备案基数不符引起的高警示药品管理不合格。根据改善重点从人员、设备、材料、方法、环境五个方面绘制“鱼骨图”，全体圈员根据特性要因评价表打分得出要因，对要因进行真因验证，利用柏拉图找出本次活动改善的真因，分别是打印不统一、监督力度不够、制度不完善、高警示药品目录不统一、标识不醒目。通过对策拟定、实施与检讨，高警示药品管理不合格率由活动前的 26.62% 下降至活动后的 12.93%，差异具有统计学意义（$\chi^2 = 5.91$，$P < 0.05$）；品管圈活动的目标达成率为 104.98%，进步率为 51.43%。**结论** 开展品管圈活动能够有效降低高警示药品管理不合格率，保障患者用药安全。

关键词：品管圈；高警示药品；管理；不合格率；用药安全

中图分类号：R952 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1950-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.042

高警示药品（high-alert medications）是指一旦使用不当发生用药错误，会对患者造成严重伤害，甚至会危及生命的药品[1]。近年来，随着医药行业的不断发展，药品种类也越来越多，但随之而来的不合理用药也显著增加。因此，保障用药安全，特别是高警示药品的合理使用成为世界卫生组织关注的重点[2-4]。品管圈（quality control circle，QCC）作为一种通过全体圈员合作来解决实际工作中发现的问题的工具已经被应用于医院管理的许多方面，但品管圈在降低高警示药品管理不合格率中的应用尚未见报道[5]。2021 年 4 月，我院药学部成立了以“降低高警示药品管理不合格率”为主题的品管圈活动，对医院高警示药品管理情况进行改进，有效降低了我院高警示药品管理不合格率，现将活动报道如下。

1 方法实施

1.1 成立品管圈

品管圈小组成员共 8 名，其中圈长 1 名，圈员 7 名，确立圈名为“药康圈”，寓意为“认真关注合理用药，保障患者用药安全、健康”。小组按照品管圈十大步骤定期开展活动[6]，对各阶段活动进展进行总结评价。

1.2 主题选定

全体圈员发动头脑风暴找出目前亟待解决的问题，首先对备选主题的“领导重视”“可行性”“迫切性”“圈能力”进行了权重分配，然后根据“5，3，1”打分原则，对提出的主题进行评分，最终选定“降低高警示药品管理不合格率”为本期品管圈活动的主题。经打分计算，此次品管圈活动的圈能力为 57.5%。高警示药品管理不合格率（%）＝抽查不合格的高警示药品数 / 同期抽查的高警示药品总数 ×100%。

1.3 现状把握

由药品质控员深入护理单元抽查 2021 年 8 月 15 日至 2021 年 8 月 21 日高警示药品共 3986 支（盒），其中不合格的共 1061 支（盒），不合格率为 26.62%。找出高警示药品管理不合格的原因，做出查检表（见表 1）和柏拉图（见图 1）。基于“二八”原则找出本次品管圈活动的改善重点为标识混乱、存放地点不对、存放数目与备案基数不符引起的高警示药品管理不合格。

1.4 目标设定

目标值＝现状值－改善值＝现状值－（现状值 × 改善重点 × 圈能力）＝26.62% －（26.62%×

基金项目：2021 年度山东省医学会临床科研资金——齐鲁专项（编号：YXH2022ZX02074）。

作者简介：路支超，男，主管药师，硕士研究生，主要从事临床药学、药事管理工作，email：422237771@qq.com *通信作者：王雷，男，主管药师，主要从事药事管理研究，email：2258586317@qq.com

表 1　现状把握查检

项目	支（盒）	百分率 /%	累计百分率 /%
标识混乱	490	46.18	46.18
存放地点不对	292	27.52	73.70
存放数目与备案基数不符	122	11.50	85.20
领用数目与所报数量不符	75	7.07	92.27
未按要求清点	25	2.36	94.63
调配差错	20	1.89	96.52
医嘱不合理	15	1.41	97.93
回收与报损不符	12	1.13	99.06
批号登记错误	10	0.94	100.00
合计	1061		100.00

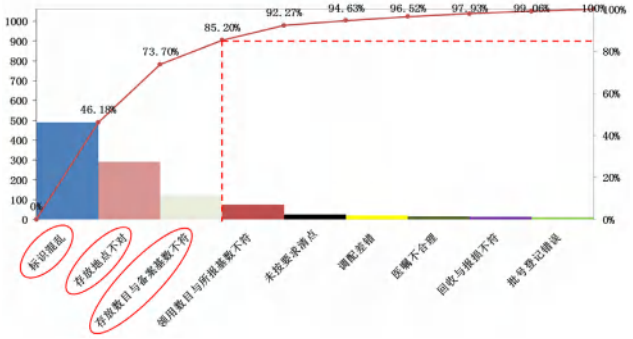


图 1　现状把握柏拉图

85.20%×57.5%）＝ 13.58%；

改善幅度＝（现状值－目标值）/ 现状值×100%＝（26.62% － 13.58%）/26.62% ＝ 48.99%。

1.5　解析

全体圈员发动“头脑风暴”，从人员、设备、材料、方法、环境五个方面找出引起标识混乱、存放地点不对、存放数目与备案基数不符的原因，绘制“鱼骨图”，详见图 2。全体圈员根据特性要因评价表打分得出要因，分别对得出的要因进行为期一周的真因验证，利用柏拉图剔除“伪要因”，找出本次活动改善的真因，分别是打印不统一、监督力度不够、制度不完善、高警示药品目录不统一、标识不醒目，详见图 3。

1.6　对策拟定

针对找出的真因，全体圈员发动头脑风暴提出所有可能的对策，从“可行性”“经济性”和“效益性”三个方面对所有提出的对策进行“1、3、5”打分，得分在 84 分以上的为可实施对策，对可实施对策进行整合，拟定出五个对策，分别是：① 制订我院《高警示药品相关制度》，统一全院高警示药品目录及备用基数；② 药学部统一打印标签；③ 医嘱、处方、输液标签上加警示符号；④ 每季度进行高警示药品培训，做到全院同质化；⑤ 制订我院高警示药品管理考核细则，缩短检查周期，将检查结果通过钉钉反馈给科主任。

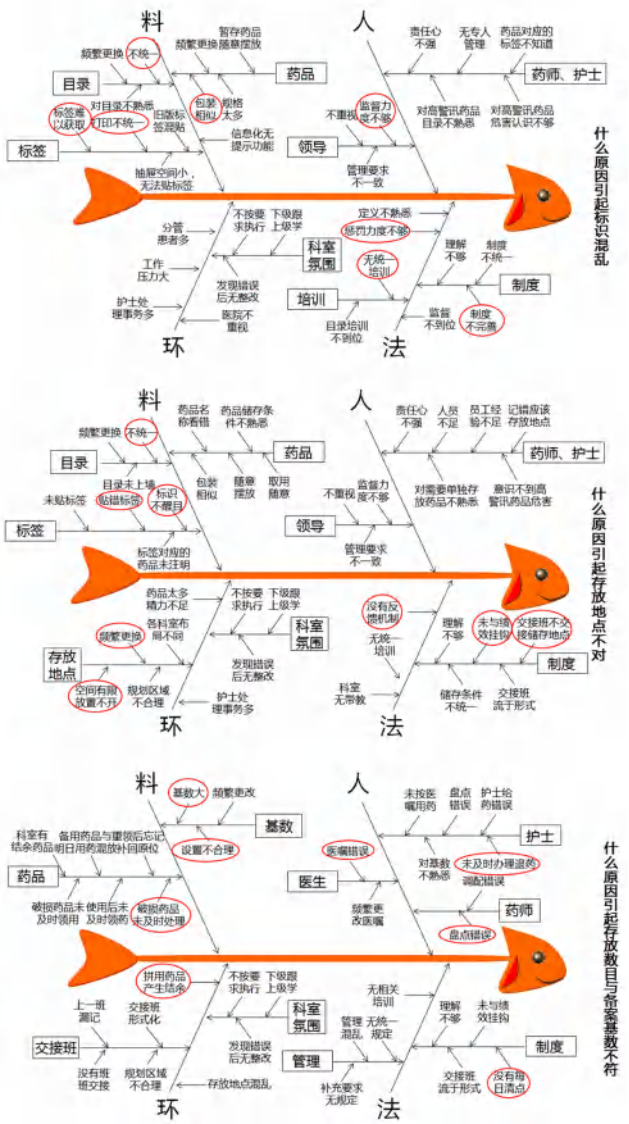


图 2　鱼骨图

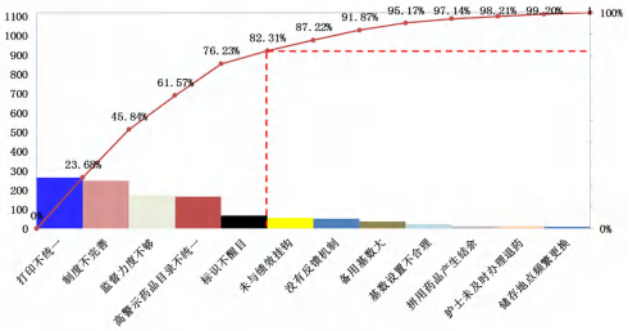


图 3　真因验证柏拉图

2　结果

2.1　有形成果

自 2021 年 10 月 1 日 至 2021 年 11 月 24 日对策实施结束，根据拟定出的对策进行实施，并对每个对策实施后的效果进行为期一周的查检。经过对策实施，高警示药品管理不合格率由改善前的 26.62% 降低至 20.38%。高警示药品管理不

合格率由对策一的 20.38% 降低至 17.00%。高警示药品管理不合格率由对策二的 17.00% 降低至 15.86%。药学部对系统中的警示符号定期维护列入标准化。高警示药品管理不合格率由对策三的 15.86% 降低至 13.26%。将定期的培训作为常规培训，制订培训计划，并列入医师综合目标管理中。高警示药品管理不合格率由对策四的 13.26% 降低至 12.93%。查检表统计结果显示，高警示药品管理不合格率从 26.62% 降至 12.93%，差异具有统计学意义（$\chi^2 = 5.91$，$P < 0.05$）。改善后柏拉图较改善前有明显改善，详见图 4。

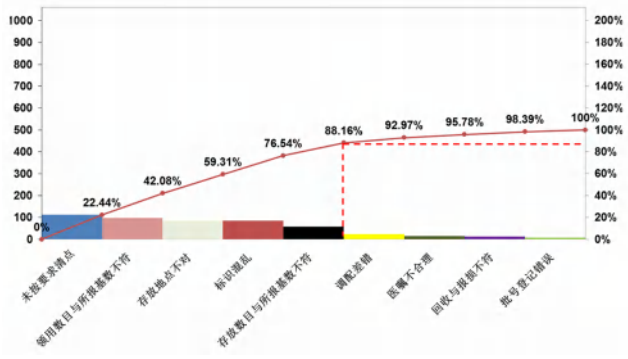


图 4 改善前后柏拉图对比

目标达标率（%）=（改善后－改善前）/（目标值－改善前）×100% =（12.93% － 26.62%）/（13.58% － 26.62%）×100% = 104.98%；

进步率（%）=（改善前－改善后）/ 改善前 ×100% =（26.62% － 12.93%）/26.62% = 51.43%。

2.2 无形成果

由全体圈成员对积极性、责任感、沟通配合、凝聚力、解决问题能力、品管手法进行自我评价。每项每人最高 5 分，最低 1 分，总分为 30 分。活动成长值=活动后平均值－活动前平均值。以正负向来评价无形成果，正向说明有提升，负向说明有下降，形成评价成果和雷达图（见图 5）。结果表明，通过品管圈活动，全体圈员在无形成果各方面均有很大的提高。

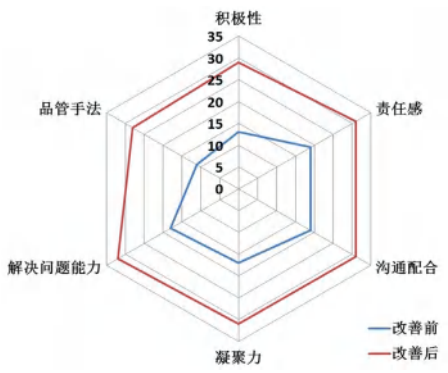


图 5 雷达图

2.3 标准化

经过此次品管圈活动，制订我院《高警示药品管理制度》，统一我院高警示药品目录，统一各科备用的高警示药品品种及数量；统一全院高警示药品标识及医嘱、处方、输液标签上的警示符号；定期组织全院培训，并制订 2022 年度高警示药品相关知识培训计划；同时，缩短检查周期，及时将检查结果进行反馈。

3 讨论

“不断提高医疗质量，保障患者就医安全”一直以来是我院秉承的医疗理念。近年来，国家加大对特殊药品的管制力度，使得毒、麻、精、放药品的管理更加标准化，但是对高警示药品的管理却未形成完整的管理体系 [7-10]。高警示药品在临床使用过程中不良事件的发生率并不高于其他药品，但是一旦发生后果会十分严重，甚至会危及患者的生命安全 [11]。药学部自 2018 年引入品管圈以来，已经取得了许多改进成果，员工发现问题、解决问题的能力也日益增强。品管圈活动是一种自上而下的质量管理活动，我院药学部利用品管圈等质量管理工具将药品的管理由以往的条款管理、经验管理阶段提升到质量管理、科学管理阶段。全员参与，以规范的步骤分析和解决问题，将改善的结果形成标准化操作流程 [12-14]。

在本研究中，经过为期一周的现场查检，发现高警示药品管理不合格率高达 26.62%，主要问题集中在标识混乱、存放地点不对、存放数目与备案基数不符。近年来考虑到遵从英文原文翻译、切合管理实际、方便对患者进行用药交代以及避免一些不必要的歧义等原因，我国将沿用已久的“高危药品”正式更名为“高警示药品”，但由于更改后的一些遗留问题未及时更正及对高警示药品的危害认知程度不够、管理部门对高警示药品的监管缺乏重视、临床用药习惯等原因导致我院高警示药品管理混乱。例如：某些科室仍然保留着“高危药品”的标识，某些科室“高危药品”和“高警示药品”标识并存，甚至某些科室同一种高警示药品贴有两种不同的标识。某些科室未将高警示药品与普通药品分开存放，导致发生用药错误。某些科室高警示药品的存放数目与所备案的基数不符，主要原因同样为用药错误所致，个别临床科室日常工作中产生的药品破损及结余未及时处理及上报，且无专人专岗负责高警示药品使用情况的清点，儿科科室甚至存在药品拼用情况。而账物不符导致的直接后果是药品的

使用无法追溯，给患者带来极大的用药风险。同时，由于信息系统中高警示药品与其他药品一样无警示信息，导致在医师开具医嘱环节、药师发药环节及护士给药环节未引起足够的重视，进而增加不良事件的发生。经过全体圈员发动头脑风暴，分析导致高警示药品管理不合格的真因并进行查检，制订切实可行的对策，主要包括制订及优化相关制度、流程，加强培训，加大处罚力度等，提高医师及护士对高警示药品的重视。通过本次品管圈活动，高警示药品管理不合格率降低至 12.93%，目标达标率为 104.98%，进步率为 51.43%，已达目标设定值。江贺春等[15]在一项高警示药品管理及风险控制的研究中通过规范高警示药品目录、制订风险点、加强培训与考核等措施，使得高警示药品管理和使用合理率降低至 19.9%，这也与本次研究结果基本一致。

合理的制度是保证日常药品管理的前提，经过此次品管圈活动，制订我院《高警示药品管理制度》，并且根据《我国高警示药品推荐目录（2019 版）》及结合我院用药情况，统一制订了我院《高警示药品目录》，实现了高警示药品管理的标准化及同质化。建立标准的日常管理流程及培训考核机制，对病区高警示药品贮存方式进行专项整治，统一高警示药品标识，为管理者提供详细的质控标准，提高药品管理效率。同时，圈员在积极性、责任感、沟通配合、凝聚力、解决问题能力、品管手法能力等无形成果方面也得到了不同程度的提高，使得药学人员内涵更加丰富，从被动管理到主动参与管理，提高了药学人员日常工作的积极性。

综上所述，药学部引入品管圈来科学的管理高警示药品，不仅能够规范医务人员对高警示药品的管理和使用，同时也能降低药害事件的发生，为保障患者就医安全打下了坚实的基础。因此，品管圈能够有效降低高警示药品管理不合格率，值得在医院管理工作中推广。

参考文献

[1] 中国医药教育协会高警示药品管理专业委员会，中国药学会医院药学专业委员会，中国药理学会药源性疾病学专业委员会 . 中国高警示药品临床使用与管理专家共识（2017）[J]. 药物不良反应杂志，2017，19（6）：409-413.

[2] 杨艳模，郭爱枝 . “瑞士奶酪模型”用于高警示药品用药安全分析及风险防范管理改进 [J]. 中南药学，2018，16（8）：1161-1163.

[3] 朱爱国，陈波，陈蕊欢 . 我院高警讯药品管理模式的建立及优化 [J]. 中国药房，2018，29（21）：2890-2893.

[4] Labib JR，Labib-Youssef MR，Fatah S. High alert medications administration errors in neonatal intensive care unit：a pediatric tertiary hospital experience [J]. Turk J Pediatr，2018，60（3）：277-285.

[5] 张文娟，罗宇，许晓丽，等 . 探讨真因验证在品管圈活动中的重要性 [J]. 中南药学，2018，16（2）：254-257.

[6] 阳巍，熊海燕，黄海花，等 . 品管圈在提高治疗药物血药浓度达标率中的应用 [J]. 中南药学，2019，17（1）：129-132.

[7] 樊莹莹，姜庆丹 . 关于修订《医疗用毒性药品管理办法》的若干建议 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（21）：1911-1913.

[8] 康阿龙，王晓妮，张苏蘅，等 . 我院 PIVAS 中 4 类特殊药品的管理与风险控制 [J]. 中国药房，2017，28（31）：4423-4428.

[9] 王敏，于珊珊，王中磊，等 . 解放军第 302 医院高警示药品的管理策略 [J]. 中国医院用药评价与分析，2017，17（2）：152-153，155.

[10] Peng TR，Wu TW. The experience of management of high-alert medications [J]. Am J Med Qual，2017，32（5）：571.

[11] Sessions LC，Nemeth LS，Catchpole K，et al. Nurses’ perceptions of high-alert medication administration safety：a qualitative descriptive study [J]. J Adv Nurs，2019，75（12）：3654-3667.

[12] Feng HX，Li GH，Xu CR，et al. A quality control circle process to improve implementation effect of prevention measures for high-risk patients [J]. Int Wound J，2017，14（6）：1094-1099.

[13] 路支超，徐洪燕，张霞，等 . 品管圈在降低自动摆药机摆药差错率的应用研究 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（7）：741-745.

[14] 张文娟，罗宇，许晓丽，等 . 探讨真因验证在品管圈活动中的重要性 [J]. 中南药学，2018，16（2）：254-257.

[15] 江贺春，倪伟健，伍章保 . 我院高警示药品管理及风险控制 [J]. 中国药房，2021，32（9）：1108-1113.

（收稿日期：2022-10-27；修回日期：2023-01-13）

碳青霉烯类的微型卫生技术评估

梁乔芳[1]，姚欣凯[1]，廖小林[2]，苏桂玉[3]，李祥[4*]（1. 广西医科大学第四附属医院/柳州市工人医院药学部，广西 柳州 545008；2. 柳州市中医医院/柳州市壮医医院，广西 柳州 545000；3. 北海市人民医院，广西 北海 536000；4. 东部战区总医院秦淮医疗区，南京 210002）

摘要：目的 对碳青霉烯类药品进行微型卫生技术评估（Mini-HTA），为医院决策者遴选、临床合理使用提供依据。**方法** 通过查阅指南、文献、说明书等，药师与医师共同构建百分制评分系统，从临床安全性、有效性、经济性、创新性、可及性共 5 个大方面分别对碳青霉烯类进行 Mini-HTA，并对分值权重进行评分。**结果** 美罗培南、亚胺培南 / 西司他丁及比阿培南得分分别为 75 分、74 分及 71.5 分。三者用于治疗产 ESBL 重症感染患者具有较好的疗效，肝功能不全患者不需调整剂量、安全性佳。三者均为医保目录收录品种，跟其他药物均存在相互作用，且与抗癫痫药存在配伍禁忌。但三者有一定差异，比阿培南和亚胺培南 / 西司他丁的价格偏高但其生产企业信誉度良好，且在全球范围内广泛使用；美罗培南虽然企业信誉度稍逊，但价格便宜；亚胺培南 / 西司他丁为原研药品，美罗培南和比阿培南为仿制药品。亚胺培南 / 西司他丁和美罗培南均可用于儿童和妊娠妇女，比阿培南除外。亚胺培南 / 西司他丁常温下保存即可，美罗培南和比阿培南需要避光保存。亚胺培南 / 西司他丁和美罗培南保质期均为两年，比阿培南的保质期稍短，仅 18 个月。**结论** 在当前医疗“零加成”政策及倡导价值医疗的形势下，本次对三种碳青霉烯类进行 Mini-HTA，医院决策者可结合自身医疗情况，合理遴选及使用该类药品。

关键词：微型卫生技术评估；药品遴选；亚胺培南 / 西司他丁；美罗培南；比阿培南
中图分类号：R977.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1954-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.043

Assessment of carbapenems by Mini health technology assessment

LIANG Qiao-fang[1], YAO Xin-kai[1], LIAO Xiao-lin[2], SU Gui-yu[3], LI Xiang[4*] (1. *Department of Pharmacy*, *the 4th Affiliated Hospital of Guangxi Medical University/Liuzhou Worker's Hospital*, *Liuzhou Guangxi* 545008; 2. *Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine* (*Liuzhou Hospital of Zhuang Medicine*), *Liuzhou Guangxi* 545000; 3. *Beihai People's Hospital*, *Beihai Guangxi* 536000; 4. *Qinhuai Medical Division*, *General Hospital of the Easter Theaer*, *Nanjing* 210002)

Abstract: Objective To provide reference for hospital decision-makers to select carbapenems by Mini health technology assessment (Mini-HTA). **Methods** Full score system was established through reviewing guidelines, literatures and instructions. From the aspects of clinical safety, effectiveness, economy, innovation and accessibility, the Mini-HTA was conducted for carbapenems, and scored on the basis of weight value. **Results** The final scores of meropenem, imipenem/cilastatin and biapenem were 75, 74 and 71.5 respectively. For ESBL patients with severe infection, all three drugs had good curative effect, and could be safely used in patients with liver dysfunction without dose adjustment. Included in the medical insurance list, they might interact with other drugs, and were incompatible with antiepileptic drugs. Biapenem and imipenem/cilastatin were somewhat expensive, but their manufacturers had a good reputation and they were widely used in the world. Meropenem was less reputable but cheaper. Imipenem/cilastatin was original varieties, while meropenem and biapenem were generic drugs. Imipenem/cilastatin and meropenem could be used in children and pregnant women, but not biapenem. Imipenem/cilastatin could be stored at room temperature, while meropenem and

基金项目：广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费课题（No.Z20200474）。
作者简介：梁乔芳，女，硕士，主管药师，主要从事医院药学和临床药学工作，email：3110163524@qq.com *通信作者：李祥，男，副主任药师，主要从事医院药学管理和临床药学工作，email：lixiang0921@126.com

biapenem should be kept away from light. The shelf life of imipenem/cilastatin and meropenem was two years, and that of biapenem was 18 months. **Conclusion**　Under the current medical policy, Mini-HTA helps decision-makers of the hospital to reasonably select the three carbapenems.

Key words: Mini-health technology assessment; drug selection; imipenem/cilastatin; meropenem; biapenem

在当前倡导价值医疗的形势下，医疗机构亟需一种科学工具辅助决策药品遴选，以保证资源的合理配置。2005 年，丹麦卫生技术评估中心（Danish Centre for Health Technology Assessment，DACEHTA）首次提出微型卫生技术评估（Mini-health technology assessment，Mini-HTA）概念，是在传统卫生技术评估基础上发展的基于医院实际需求的卫生技术评估，应用循证医学和传统卫生技术评估的原理，运用多学科方法综合考量药品、设备、诊疗、技术的临床必要性、经济性等因素，以对相关卫生技术作出全面系统评价的决策工具，其目的是为医院决策者遴选药品、引入医疗技术设备等提供参考依据，优化卫生资源配置，提高有限卫生资源质量和效率，帮助医疗机构创造“最佳性价比”的医疗服务 [1-2]。

碳青霉烯类抗菌药物是一类抗菌谱广、抗菌活性强的β-内酰胺类药物，为临床治疗多重耐药革兰氏阴性杆菌（G^-）的首选。近年来，随着该类药物的广泛使用，甚至是不合理使用或滥用，耐碳青霉烯类革兰氏阴性杆菌（CRO）逐年增多，给感染治疗和院感控制带来了极大挑战 [3]。作为医疗机构，如何从药品引进源头遏制细菌耐药蔓延是当前亟待解决的课题。本研究运用 Mini-HTA 对碳青霉烯类中常见品种进行评估，以期为药品遴选及合理使用提供参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

通过查阅药品说明书，检索中国知网、万方数据等中文数据库及 PubMed、Web of Science 等外文数据库，药物临床使用相关指南获取药物专业属性及使用推荐信息，药品价格通过查询江苏省医疗机构药品交易采购平台挂网价格获得；医保、基药情况、集采及抗菌药物分级管理通过检索 2022 年版《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》、2018 版《国家基本药物目录》、国家集采药品目录及 2019 版江苏省抗菌药物分级管理目录获得；药品市场属性及生产企业相关信息通过查阅美国药品管理局（FDA）、欧洲药品管理局（EMEA）、日本药品数据库（PMDA）、国家药品监督管理局（NMPA）网站所发布的药品信息和美国《制药经理人杂志》（Pharm Exec）公布的 2022 年全球制药企业 50 强、中国工信部医药工业百强榜及中国医药研发产品线最佳工业企业 20 强企业的目录获得。各项评分的分值及权重由临床药师与医师逐项沟通后确定。

1.2　方法

采用药品 Mini-HTA 量表，评估亚胺培南 / 西司他丁（以下简称亚胺培南）、美罗培南及比阿培南临床安全性、有效性、经济性、创新性，可及性共 5 个维度，85 个条目进行系统评估，见表 1。“安全性”“有效性”“经济性”这 3 个维度为药品遴选的核心属性，是所有医疗机构药品遴选的主要评价指标，分值为 55 分；余下维度分值 45 分，其中药品创新性 15 分，在一定程度上反映了药品在临床使用的疗效和安全性。医保属性、基药属性、集采属性、抗菌药物级别属性、储存条件、药品效期、市场属性及企业属性等反应药品的惠民程度及药品质量的优劣。

2　结果

2.1　安全性

2.1.1　不良反应　根据《不良反应分级及常见不良事件评价标准（CTCAE）5.0 版》中的分级标准及 CTC 分级标准进行评价。

亚胺培南与美罗培南比较，不良反应发生类型类似，但发生率有所不同。罗少华等 [4] 进行亚胺培南与美罗培南治疗重症感染患者中安全性 Meta 分析结果提示，除美罗培南引起皮疹的发生率高于亚胺培南外，亚胺培南在其他系统不良反应发生率大多高于美罗培南，特别是在神经系统方面。与国外 Edwards 等 [5] 系统评价结果类似。比阿培南的不良反应主要有恶心、呕吐、腹泻等胃肠道反应；皮疹；谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）升高，嗜酸性粒细胞增多等实验室检查异常等。相关 Meta 分析提示 [6]，比阿培南总体不良反应发生率显著低于美罗培南。与陈杨等 [7] 对呼吸系统、泌尿系统细菌感染的随机对照多中心临床研究结果类似，比阿培南比美罗培南的安全性更好。综上所述，亚胺培南不建议用于中枢神经系统感染治疗，评价得分为 6 分。比阿培南相比较美罗培南虽然不良反应发生率有差

表 1 碳青霉烯类的 Mini-HTA 评估细则

Tab 1 Mini-HTA detailed evaluation of carbapenems

项目名称	内容	评估细则
安全性（20）	不良反应发生率及严重程度（7）	□ 7 轻度（症状轻微，无需治疗）或 CTC 1 ～ 2 级
		□ 6 中度（症状明显，需要干预）或 CTC 3 级
		□ 5 重度（症状严重，危及生命）或 CTC 4 ～ 5 级，发生率小于 0.01%，十分罕见
		□ 4 重度（症状严重，危及生命）或 CTC 4 ～ 5 级，发生率（0.01% ～ 0.1%，含 0.01%）罕见
		□ 3 重度（症状严重，危及生命）或 CTC 4 ～ 5 级，发生率（0.1% ～ 1%，含 0.1%）偶见
		□ 2 重度（症状严重，危及生命）或 CTC 4 ～ 5 级，发生率（1% ～ 10%，含 1%）常见
		□ 1 重度（症状严重，危及生命）或 CTC 4 ～ 5 级，发生率≥ 10% 十分常见
	特殊人群用药（6）	□ 1 儿童可用
		□ 1 老人可用
		□ 1 孕妇可用
		□ 1 哺乳期妇女可用
		□ 1 肝功能异常可用
		□ 1 肾功能异常可用
	药物相互作用（3）	□ 3 轻中度：一般无需调整用药剂量
		□ 2 重度：需要调整剂量
		□ 1 禁忌：禁止在同一时段使用
	其他（可多选）(4）	□ 1 不良反应均可逆
		□ 1 无致畸致癌
		□ 1 无特别用药警示
		□ 1 上市时间大于 5 年
有效性（20）	指南推荐级别和强度（20）	□ 20 诊疗规范推荐
		□ 16 指南Ⅰ级推荐（一级证据 16，二级证据 15，三级证据 14，其他 13）
		□ 12 指南推荐（一级证据 12，二级证据 11，三级证据 10，其他 9）
		□ 8 专家共识推荐
		□ 4 以上均无推荐
经济性（15）	较同通用名药品（5）	□ 5 日均治疗费用最低
		□ 4 日均治疗费用低于中位数
		□ 3 日均治疗费用居中
		□ 2 日均治疗费用高于中位数
		□ 1 日均治疗费用最高
	同药理作用机制的药品（5）	□ 5 日均治疗费用最低
		□ 4 日均治疗费用低于中位数
		□ 3 日均治疗费用居中
		□ 2 日均治疗费用高于中位数
		□ 1 日均治疗费用最高
	较主要适应证可替代药品（5）	□ 5 日均治疗费用最低
		□ 4 日均治疗费用低于中位数
		□ 3 日均治疗费用居中
		□ 2 日均治疗费用高于中位数
		□ 1 日均治疗费用最高
创新性（15）	适应证 / 选择性（4）	□ 4 临床必需，首选 / 一线用药
		□ 2 临床需要，次选 / 二线用药
		□ 1 可选 / 替代药品较多
	药理作用 / 药效学（3）	□ 3 疗效确切，作用机制明确
		□ 2 疗效确切，作用机制尚不十分明确
		□ 1 疗效一般，作用机制不明确
	体内过程 / 药动学（3）	□ 3 体内过程明确 / 药动学参数完整
		□ 2 体内过程基本明确 / 药动学参数不完整
		□ 1 体内过程尚不明确 / 无药动学相关研究
	一致性评价（5）	□ 5 原研药品 / 参比药品 / 优于前两者
		□ 3 通过一致性评价仿制药品
		□ 1 非原研或未通过一致性评价药品
可及性（30）	医保类型（5）	□ 5 国家医保甲类，且没有限制条件
		□ 4 国家医保甲类，有限制条件
		□ 3 国家医保乙类，且没有限制条件

续表 1

项目名称	内容	评估细则
		□ 2 国家医保乙类，有限制条件
		□ 1 不在国家医保目录
	基本药物或集采药物属性（5）	□ 5 在国家集采药品目录中
		□ 4 在江苏省集采药品目录中
		□ 3 不在国家集采药品目录中
		□ 2 不在江苏省集采药品目录中
		□ 1 不在目录中
	抗菌药物级别（3）	□ 3 非限制级
		□ 2 限制级
		□ 1 特殊使用级
	储存条件（5）	□ 5 常温贮藏
		□ 4 常温贮藏，避光或遮光
		□ 3 阴凉贮藏
		□ 2 阴凉贮藏，避光或遮光
		□ 1 冷藏贮藏
	药品有效期（4）	□ 4 大于等于 3 年
		□ 3 大于等于 2 年小于 3 年
		□ 2 大于 1 年小于 2 年
		□ 1 小于等于 1 年
	市场属性（3）	
	该通用名药品全球使用情况（1.5）	□ 1.5 美国、欧洲、日本均已上市
		□ 1 美国、欧洲、日本上市
		□ 0.5 美国、欧洲、日本均未上市
	该厂家药品全球使用情况（1.5）	□ 1.5 美国、欧洲、日本均已上市
		□ 1 美国、欧洲、日本上市
		□ 0.5 美国、欧洲、日本均未上市
	企业信誉度（5）	□ 5 生产企业为世界销量前 50 制药企业
		□ 4 生产企业为工信部医药工业百强榜及中国医药研发产品线最佳工业企业 20 强
		□ 3 生产企业为工信部医药工业百强榜企业
		□ 2 生产企业为中国医药研发产品线最佳工业企业 20 强
		□ 1 生产企业不是工信部医药工业百强榜及中国医药研发产品线最佳工业企业 20 强

异，但不良反应发生程度均为轻度，停药后均消失或好转，评价两药得分均为 7 分。

2.1.2　特殊人群用药　亚胺培南可用于年龄大于 3 个月的患者，对 3 个月以内的婴儿，尚无足够临床使用资料；根据 FDA 妊娠期用药危险性分类，亚胺培南为 C 类，孕妇仅在利大于弊时应用本品；乳汁中可测出亚胺培南，如确定有必要对哺乳期妇女使用时，患者需停止哺乳。亚胺培南主要经肾脏以原形排泄，在尿液中的排出量占血浆清除率的 70%，西司他丁尿排泄为给药剂量的 70% ～ 80%，肾功能不全时，两者的半衰期延长，老年患者应慎重选择用药剂量，肾功能损伤患者应行剂量调整 [8]。美罗培南对年龄 3 个月以下婴幼儿，疗效和耐受性尚不清楚，不推荐使用；该药妊娠期用药风险属 B 类，需在有明确指征时应用；哺乳期妇女应用时应暂停哺乳；美罗培南 70% 经肾脏排泄，少量经胆汁排泄 [9]，因此对于肾功能受损及老年人患者需要行剂量调整。比阿培南主要以原形经肾脏排泄，严重肾功能不全者及老年患者慎用，对孕妇、妊娠妇女及儿童用药的安全性尚不明确。碳青霉烯类抗菌药物主要肾脏排泄，肝功能不全患者不需进行剂量调整。综上所述，亚胺培南和美罗培南得分均为 6 分，比阿培南得分为 3 分。

2.1.3　药物相互作用　碳青霉烯类药物在临床的广泛使用，与其他药物发生相互作用（DDI）的风险大大增加。有研究表明，亚胺培南与丙磺舒、更昔洛韦、茶碱、氨曲南联合使用，不良反应增多 [10-11]。美罗培南与丙磺舒、别嘌醇联合使用，美罗培南半衰期延长、毒性增加。比阿培南是有机阴离子转运体 OATs 的底物，与甲氨蝶呤合用，比阿培南暴露量显著减少，清除率增加 [12]，而与阿昔洛韦联用则刚好相反 [13]。研究表明，碳青霉烯类与丙戊酸钠或双丙戊酸钠会增加患者癫痫的风险，不推荐丙戊酸钠或双丙戊酸钠与碳青霉烯类合用 [14-15]。鉴于相应风险发生的广度与程度，该项评价碳青霉烯类药物得分均为 1 分。

2.1.4　其他　鉴于评价目标药品不良反应均为可逆性，无致畸、致癌性报道，且 FDA、EMEA、

NMPA 均无特别用药警示，上市时间均大于 5 年。综合评价碳青霉烯类药物此项得分均为 4 分。

2.2 有效性

根据指导原则、指南及专家共识，碳青霉烯类主要用于多重耐药但对本类药物敏感的需氧革兰氏阴性杆菌所致严重感染、脆弱拟杆菌等厌氧菌与需氧菌混合感染的重症患者以及病原菌尚未查明的严重免疫缺陷患者感染的经验治疗。碳青霉烯类体内分布无明显差异，治疗感染部位无差别推荐；可用于成人或儿童，但比阿培南不作为儿童感染的选择；详见表 2。

相关系统评价文献表明，比阿培南治疗敏感菌引起的呼吸系统和泌尿系统感染有效性与美罗培南和亚胺培南相当，但在中、重度下呼吸道感染中，比阿培南临床有效率显著高于亚胺培南；美罗培南治疗重症肺部感染有效率方面相比亚胺培南，具有更高选择性。在粒缺伴发热肿瘤患者中，美罗培南与亚胺培南有效性与安全性一致。有研究表明美罗培南能够缩短老年重症急性胰腺炎（SAP）患者白细胞正常值恢复时间、湿啰音消失时间、退热时间、咳嗽消失时间和住院时间，增强临床疗效，安全性较高。综合表 2 ～ 3 分析结果，亚胺培南得分为 16 分、美罗培南为 16 分、比阿培南为 12 分。

2.3 经济性

2.3.1 同通用名药品 三种药物同通用名药品经济型评价结果见表 4，目标药品注射用亚胺培南西司他丁钠 1（美国默沙东公司）的日治疗费用最高，注射用美罗培南 1（石药集团欧意药业有限公司）和注射用比阿培南（正大天晴药业股份有限公司）的日治疗费用低于中位数。因此，同通用名药品经济学评估亚胺培南、美罗培南和比阿培南得分分别为 1 分、4 分、4 分。

2.3.2 同药理作用机制的药品 同药理作用机制的药品只有注射用厄他培南（307.77 元 /1 g，美国默沙东公司），目标药物注射用亚胺培南 1 的日治疗费用最高，注射用美罗培南 1 的日治疗费用高于中位数，注射用比阿培南的日治疗费用低于中位数，故亚胺培南、美罗培南和比阿培南得分分别为 1 分、2 分、4 分。

2.3.3 主要适应证可替代药品 根据国内外指南，碳青霉烯类药物主要用于治疗产 ESBL 革兰氏阴性菌患者，相关可替代品种主要为哌拉西林纳他唑巴坦及头孢哌酮钠舒巴坦钠。查阅江苏省药品采购平台，注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠价格为 83.41 元 /2.5 g（华北制药股份有限公司），头孢哌酮钠舒巴坦钠价格为 65.74 元 /1.5 g（辉瑞制药有限公司）。目标药物亚胺培南 1 的日治疗费用最高，美罗培南 1 的日治疗费用高于中位数，比阿培南的日治疗费用低于中位数，故亚胺培南、美罗培南和比阿培南得分分别为 1 分、2 分、4 分。

2.4 创新性

碳青霉烯类药物抗菌机制相似，通过抑制细胞壁黏肽合成酶，即青霉素结合蛋白（PBPs），从而阻碍细胞壁黏肽合成发挥抗菌活性，对宿主毒性小。但不同药物对 PBPs 亚型亲和力不同，亚胺培南对 PBP2 亲和力强，美罗培南对 PBP2 和 PBP3 结合力强，比阿培南对 PBP2 和 PBP1b 亲和力强 [41]。在分布、代谢、排泄等环节，体内药动学过程相似，药动学参数完整。亚胺培南为原研药品，美罗培南和比阿培南已通过一致性评价仿制药品。综上，创新性得分亚胺培南、美罗培南和比阿培南分别为 13 分、11 分、11 分。

2.5 可及性

目标药物均被纳入 2022 年版《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》，为乙类，医保限制用药，故医保属性得分均为 3 分。查阅各批次集采目录可知，目标药物均属于国家集采药品，故得分均为 5 分。根据抗菌药物分级管理标准，目标药物均为特殊使用级抗菌药物，故得分均为 1 分。药品包装属性方面，亚胺培南密闭，25 ℃以下保存，有限期 24 个月，故得 8 分；美罗培南密闭，在凉暗干燥处保存（避光并不超过 20 ℃），有限期 24 个月，故得 5 分；比阿培南遮光，密闭保存，有效期 18 个月，故得 6 分。

市场属性方面，亚胺培南和美罗培南生产企业生产的药品在美国、欧洲、日本均已上市，故得分均为 3 分。比阿培南只在欧洲、日本上市，未在美国上市，但该药生产企业生产的药品已在美国、欧洲、日本上市，故得分 2.5 分。

查阅 2022 年美国制药经理人杂志发布的全球制药企业 50 强榜单，生产亚胺培南美国默克公司与生产美罗培南石药集团均为世界销量前 50 强，中国工信部 2020 年中国医药工业百强榜及 2021 年中国医药研发产品线最佳工业企业榜单，比阿培南生产企业为工信部医药工业百强榜及中国医药研发产品线最佳工业企业 20 强，因此，企业信誉度亚胺培南、美罗培南和比阿培南得分分别为 5 分、5 分、4 分。

3 结果

通过对三种碳青霉烯类抗菌药物进行 HTA，美罗培南得分最高，为 75 分，亚胺培南为 74 分，比阿培南为 71.5 分。

4 讨论

4.1 评分结果分析

表 2　碳青霉烯类药物在国内外诊疗规范 / 指南 / 专家共识中的推荐情况

Tab 2　Recommendation of carbapenems in diagnostic and treatment practices/guideline/expert consensus

年份	名称	推荐药品	推荐情况
2010	IDSA 指南：成人与儿童复杂腹腔内感染的诊断与治疗 [16]	亚胺培南、美罗培南、比阿培南	推荐碳青霉烯类（儿童不选比阿培南）抗菌药物作为治疗卫生保健相关性复杂性腹腔内感染（cIAI）和部分社区获得性 cIAI 产 ESBL 的肠杆菌科细菌的首选
2015	抗菌药物临床应用指导原则（2015 年版）	碳青霉烯类	多重耐药但对本类药物敏感的需氧革兰氏阴性杆菌所致严重感染；脆弱拟杆菌等厌氧菌与需氧菌混合感染的重症患者；病原菌尚未查明的严重免疫缺陷患者感染的经验治疗
2015	尿路感染诊断与治疗中国专家共识——复杂性尿路感染 [17]	亚胺培南、美罗培南、比阿培南	亚胺培南、美罗培南及比阿培南可用于尿路感染重症或初始经验性治疗失败的患者
2016	中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南 [18]	碳青霉烯类	推荐碳青霉烯类单药或联合用药用于对有误吸风险的社区获得性肺炎（CAP）患者经验性用药；也推荐用于有铜绿假单胞菌感染危险因素的 CAP，需住院或入住 ICU 的患者
2016	美国 2016 年成人医院获得性肺炎和呼吸机相关性肺炎的处理临床实践指南 [19]	亚胺培南、美罗培南	推荐亚胺培南、美罗培南单药经验治疗死亡高风险和无增加耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）感染因素的医院获得性和呼吸机相关性肺炎感染；没有死亡高风险但有增加 MRSA 感染因素经验性选用亚胺培南、美罗培南联合用药之一；死亡高风险或者 90 d 内曾给予静脉抗菌药物者经验性选用亚胺培南、美罗培南联合用药之一；如果未覆盖 MRSA，应覆盖甲氧西林敏感金葡菌（MSSA），可选药物有亚胺培南或美罗培南等
2017	中国女性尿路感染诊疗专家共识 [20]	亚胺培南、美罗培南、比阿培南	用于女性复杂性尿路感染初始治疗失败或严重病例经验治疗
2017	2017 年 IDSA 临床实践指南：医疗相关性脑室炎和脑膜炎 [21]	美罗培南	美罗培南作为医疗相关性脑室炎和脑膜炎的经验性治疗联合用药之一（强、低）
2017	国家抗微生物治疗指南	亚胺培南、美罗培南、比阿培南	① 碳青霉烯类首选用于抗感染治疗急性常继发于肺炎的社区获得性和医院获得性脓胸；② 亚胺培南、美罗培南、比阿培南作为免疫缺陷高危患者初始抗感染治疗首选；③ 亚胺培南、美罗培南作为中性粒细胞减少症伴发热高危患儿首选药物
2018	中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南 [22]	碳青霉烯类	推荐碳青霉烯类单药或者联合用于医院获得性肺炎（HAP）非危重、多重耐药性（MDR）菌感染高风险及呼吸机相关性肺炎（VAP）、MDR 感染低风险者抗铜绿假单胞菌经验性治疗；推荐碳青霉烯类用于 HAP 危重及 VAP、MDR 菌感染低风险者经验性抗铜绿假单胞菌联合用药之一
2019	中国腹腔感染诊治指南（2019 版）[23]	亚胺培南、美罗培南、比阿培南	亚胺培南、美罗培南、比阿培南等碳青霉烯类药物作为重度 CA-IAI、HA-IAI 患者推荐经验性抗感染治疗的单一用药（中等质量证据，强烈推荐）
2019	2019 ATS & IDSA 临床实践指南 成人社区获得性肺炎的诊断和治疗 [24]	亚胺培南、美罗培南	推荐美罗培南或亚胺培南用于成人社区获得性肺炎覆盖铜绿假单胞菌的经验性用药（强推荐，证据质量中等）
2019	慢性阻塞性肺疾病急性加重抗感染治疗中国专家共识 [25]	碳青霉烯类	碳青霉烯类是 AECOPD 超广谱 β- 内酰胺酶类肠杆菌科敏感菌最可靠的治疗药物；亚胺培南、美罗培南常作为产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌治疗的联合用药之一；亚胺培南、美罗培南常作为多重耐药鲍曼不动杆菌感染、泛耐药铜绿假单胞菌感染、全耐药铜绿假单胞菌感染治疗的联合用药之一
2020	中国中性粒细胞缺乏伴发热患者抗菌药物临床应用指南 [26]	碳青霉烯类	推荐碳青霉烯类单药预防初始治疗时感染病情较重（如血流动力学不稳定或感染性休克）或高度怀疑患者存在 MDR 菌感染的危险
2021	神经外科中枢神经系统感染诊治中国专家共识 [27]	美罗培南	美罗培南尽早经验性用于治疗怀疑中枢神经系统细菌性的感染
2022	IDSA 指南：抗菌药物耐药性革兰氏阴性菌感染的治疗（V1.0）[28]	亚胺培南、美罗培南	亚胺培南、美罗培南是 ESBL-E 所致肾盂肾炎、复杂尿路感染（cUTIs）及尿路外感染的首选治疗方案；当碳青霉烯酶检测结果不可用或为阴性时，标准输注美罗培南是对厄他培南耐药（厄他培南 *MIC* ≥ 2 mg • mL^{-1}）但对美罗培南敏感（美罗培南 *MIC* ≤ 1 mg • mL^{-1}）的 CRE 引起的膀胱炎的首选治疗方案；当碳青霉烯酶类检测结果不可用或为阴性时，延长输注美罗培南是治疗对厄他培南耐药（厄他培南 *MIC* ≥ 2 mg•mL^{-1}），但对美罗培南敏感（美罗培南 *MIC* ≤ 1 mg•mL^{-1}）的 CRE 引起的肾盂肾炎、cUTIs 及尿路外感染的首选治疗方案
2022	成人吸入性肺炎诊断和治疗专家建议 [29]	亚胺培南、美罗培南	碳青霉烯（亚胺培南、美罗培南）单独或联合用于医院获得性吸入性肺炎，耐药风险高患者的治疗（ⅡB）

通过卫生技术评估三种碳青霉烯类抗菌药物表明，在安全性和有效性属性方面，亚胺培南和美罗培南更优，一方面，由于比阿培南在儿童及妊娠哺乳期的安全性未确定，导致在这些特殊人群用药方面缺乏根据，另一方面，亚胺培南和美罗培南上市时间较长，临床应用经验较多，有更

表 3 碳青霉烯类药物的 Meta 分析及系统评价推荐情况

Tab 3 Meta-analysis and systematic review of carbapenems

文献类型	纳入研究	对照组	观察组	结果
Meta 分析	10 项 RCT，949 例 [30]	亚胺培南	比阿培南	比阿培南在中、重度下呼吸道感染治疗中的临床有效率显著及细菌清除率亦显著高于亚胺培南
Meta 分析	16 项 RCT，3055 例 [31]	亚胺培南	美罗培南	美罗培南比亚胺培南在治疗重症感染中的临床有效率高；在临床治愈率与细菌清除率，两者相当
Meta 分析	11 项 RCT，1873 例 [32]	美罗培南	比阿培南	在治疗细菌性感染中，临床总有效率和细菌清除率，比阿培南优于美罗培南
Meta 分析	10 项 RCT，881 例 [33]	头孢他啶	美罗培南	美罗培南能够缩短老年重症急性胰腺炎患者的白细胞值恢复正常时间、湿啰音消失时间、退热时间、咳嗽消失时间和住院时间，增强临床疗效，安全性较高
Meta 分析	9 项 RCT，707 例 [34]	亚胺培南	美罗培南	美罗培南在中、重度肺部感染的治疗中细菌清除率、临床治愈率略优于亚胺培南
Meta 分析	12 项 RCT，1260 例 [35]	亚胺培南	美罗培南	在治疗重症肺部感染方面，美罗培南的临床有效率、治愈率、细菌清除率均比亚胺培南高，美罗培南在治疗重症肺部感染方面具有更高的选择性
Meta 分析	6 项 RCT，409 例 [36]	亚胺培南	美罗培南	在肿瘤患者中性粒细胞缺乏伴发感染的治疗中，美罗培南与亚胺培南临床治愈率、临床有效率、细菌清除率相当
Meta 分析	19 项 RCT，7380 例 [37]	美罗培南 / 韦博巴坦（MV）	多利培南、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、比阿培南	厄他培南、亚胺培南、美罗培南、比阿培南的治疗成功率与韦博巴坦相似，是 cUTIs 经验疗法的合理选择
Meta 分析	15 项 RCT，6745 例 [38]	替加环素	多利培南、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、比阿培南	治疗复杂腹腔内感染中，临床治疗成功率由高到低依次为多利培南、美罗培南、亚胺培南、比阿培南、替加环素和亚胺培南 / 西司他丁 / 瑞来巴坦
RCT	288 例 [39]	美罗培南	比阿培南	比阿培南与美罗培南治疗呼吸系统感染和泌尿系统感染，两组间临床治愈率、细菌学疗效差异无统计学意义
Meta 分析	9 项 RCT，1307 例 [40]	美罗培南、亚胺培南	比阿培南	比阿培南治疗敏感菌所引起的呼吸系统和泌尿系统细菌性感染的总有效率、细菌清除率，与美罗培南和亚胺培南相当

表 4 碳青霉烯类药物同通用名药品经济性评价结果

Tab 4 Economic evaluation of carbapenems with same gerneral name

药品名称	规格 /g	零售价 / 元	日治疗费用 / 元
注射用亚胺培南西司他丁钠 1	1.0	131.60	526.40 ～ 1052.80
注射用亚胺培南西司他丁钠 2	1.0	76.49	305.96 ～ 611.92
注射用亚胺培南西司他丁钠 3	1.0	71.90	287.60 ～ 575.20
注射用亚胺培南西司他丁钠 4	1.0	70.80	283.20 ～ 566.40
注射用亚胺培南西司他丁钠 5	1.0	96.09	384.36 ～ 768.72
注射用亚胺培南西司他丁钠 6	1.0	70.79	283.16 ～ 566.32
注射用美罗培南 1	0.5	80.55	241.65 ～ 966.60
注射用美罗培南 2	0.5	45.00	135.00 ～ 540.00
注射用美罗培南 3	0.5	88.09	264.27 ～ 1057.08
注射用美罗培南 4	0.5	153.00	459.00 ～ 1836.00
注射用美罗培南 5	0.5	95.80	287.40 ～ 1149.60
注射用美罗培南 6	0.5	86.30	258.90 ～ 1035.60
注射用美罗培南 7	0.5	73.76	221.28 ～ 885.12
注射用美罗培南 8	0.5	155.90	467.70 ～ 1870.80
注射用比阿培南 1	0.3	104.83	209.66 ～ 419.32
注射用比阿培南 2	0.3	216.00	432.00 ～ 864.00
注射用比阿培南 3	0.3	85.00	170.00 ～ 340.00
注射用比阿培南 4	0.3	108.80	217.60 ～ 435.20
注射用比阿培南 5	0.3	107.50	215.00 ～ 430.00

多的循证证据、指南及共识倾向于前两者，而对比阿培南的证据稍逊。在经济性、创新性和可及性方面，由于亚胺培南和美罗培南生产企业均为全球前 50 强制药企业，可在一定程度上反映药品的质量和疗效，同时也造成两者的药品经济性劣于比阿培南。尽管亚胺培南和美罗培南价格偏高，但其生产企业信誉度良好且在全球广泛使用，因此两者的综合得分较比阿培南高。

4.2 Mini-HTA 的局限性

由于我国医院 HTA 起步较晚，评估人员专业构成单一，也没有设立专门的 HTA 机构，可能导致缺少必要的跨学科评价及可能存在利益冲突导致的偏倚，再加上 Mini-HTA 的时间限制，可能对部分问题阐述不足等。另外，Mini-HTA 的评价指标及评价结果是动态变化的，随着真实世界研究数据、循证证据、国家政策及上市后药品的评估等变化而变化，评估人员需要及时更新评价结果，不断完善。

尽管如此，在当前医疗“零加成”政策及倡导价值医疗的形势下，Mini-HTA 以其评估周期短、耗费资源少、劳动成本低等优势，能为医院决策层科学决策提供足够的循证依据，促进合理配置卫生资源，实现药品、设备及耗材等的质量 - 效率最大化提供了有价值的决策依据。为此，国家卫生健康委员会医疗管理服务指导中心分别于 2018 年和 2019 年先后开展了两次医院卫生技术评估试点项目，需要更完善的技术手段，构建适合我国国情、医疗卫生、医疗保障体系和医疗服务收费水平等的

Mini-HTA 指标体系及评估方法有着重要的意义。

参考文献

[1] Ehlers L，Vesterdard M，Kidholm K，et al. Doing mini-health technology assessment in hospitals：a new concept of decision support in health care? [J]. Int J Technol Assess Health Care，2006，22（3）：295-301.

[2] 刘文彬，施李正，庞伟明，等 . 不同类型研究机构卫生技术评估研究结果转化情况的比较研究 [J]. 南京医科大学学报（社会科学版），2015，12（6）：477-480.

[3] 邹凤梅，吴玲，李可可，等 . 耐碳青霉烯类抗菌药物革兰阴性杆菌临床分布及耐药基因调查 [J]. 临床检验杂志，2021，39（8）：607-610.

[4] 罗少华，罗骞 . 美罗培南与亚胺培南 / 西司他丁在治疗重症感染患者中的安全性 Meta 分析 [J]. 中国抗生素杂志，2019，44（8）：968-974.

[5] Edwards SJ，Emmas CE，Campbell HE. Systematic review comparing meropenem with imipenem plus cilastatin in the treatment of severe infections [J]. Curr Med Res Opin，2005，21（5）：785-794.

[6] 王晓，张小可，宗志勇，等 . 注射用比阿培南治疗细菌性下呼吸道感染与尿路感染的随机、盲法、阳性对照、多中心临床研究 [A]// 第十三次全国临床药理学学术大会论文汇编 [C]. 中国药理学会，2012.

[7] 陈杨，修清玉，方正，等 . 注射用比阿培南治疗呼吸系统、泌尿系统细菌感染的随机对照多中心临床研究 [J]. 第二军医大学学报，2014，35（4）：388-393.

[8] Rogers JD，Meisinger MA，Ferber F，et al. Pharmacokinetics of imipenem and cilastatin in volunteers [J]. Rev Infect Dis，1985，7（Suppl 3）：S435-46.

[9] Moon YS，Chung KC，Gill MA. Pharmacokinetics of meropenem in animals，healthy volunteers，and patients [J]. Clin Infect Dis，1997，24（Suppl 2）：S249-255.

[10] Semel JD，Allen N. Seizures in patients simultaneously receiving theophylline and imipenem or ciprofloxacin or metronidazole [J]. South Med J，1991，84（4）：465-468.

[11] Brorson JE，Larsson P. Cefoxitin and imipenem（*N*-formimidoyl thienamycin）can be antagonistic to aztreonam [J]. J Antimicrob Chemother，1984，14（6）：667-668.

[12] 董婧，李婷婷，邱志霞，等 . 比阿培南与甲氨蝶呤、呋塞米在大鼠体内的药代动力学相互作用 [J]. 中国医药导报，2019，16（31）：22-25.

[13] 转运体介导的比阿培南肾排泄及药物相互作用研究 [EB/OL]. 上海市浦东新区公利医院，2020-09-02.

[14] Mori H，Takahashi K，Mizutani T. Interaction between valproic acid and carbapenem antibiotics [J]. Drug Metab Rev，2007，39（4）：647-657.

[15] Haroutiunian S，Ratz Y，Rabinovich B，et al. Valproic acid plasma concentration decreases in a dose-independent manner following administration of meropenem：a retrospective study [J]. J Clin Pharmacol，2009，49（11）：1363-1369.

[16] Solomkin JS，Mazuski JE，Bradley JS，et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children：guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America [J]. Surg Infect（Larchmt），2010，11（1）：79-109.

[17] 尿路感染诊断与治疗中国专家共识编写组 . 尿路感染诊断与治疗中国专家共识（2015 版）——复杂性尿路感染 [J]. 中华泌尿外科杂志，2015，36（4）：241-244.

[18] 瞿介明，曹彬 . 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南（2016 年版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2016，39（4）：253-279.

[19] Kalil AC，Metersky ML，Klompas M，et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia：2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society [J]. Clin Infect Dis，2016，63（5）：e61-e111.

[20] 中国女医师协会肾脏病与血液净化专委会 . 中国女性尿路感染诊疗专家共识 [J]. 中华医学杂志，2017，97（36）：2827-2832.

[21] Tunkel AR，Hasbun R，Bhimraj A，et al. 2017 Infectious Diseases Society of America's Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis [J]. Clin Infect Dis，2017，64（6）：e34-e65.

[22] 施毅 . 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南（2018 年版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2018，41（4）：255-280.

[23] 吴秀文，任建安 . 中国腹腔感染诊治指南（2019 版）[J]. 中国实用外科杂志，2020，40（1）：1-16.

[24] Metlay JP，Waterer GW，Long AC，et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America [J]. Am J Respir Crit Care Med，2019，200（7）：e45-e67.

[25] 慢性阻塞性肺疾病急性加重抗感染治疗中国专家共识编写组 . 慢性阻塞性肺疾病急性加重抗感染治疗中国专家共识 [J]. 国际呼吸杂志，2019，39（17）：1281-1296.

[26] 中华医学会血液学分会，中国医师协会血液科医师分会 . 中国中性粒细胞缺乏伴发热患者抗菌药物临床应用指南（2020 年版）[J]. 中华血液学杂志，2020，41（12）：969-978.

[27] 中国医师协会神经外科医师分会神经重症专家委员会，北京医学会神经外科学分会神经外科危重症学组 . 神经外科中枢神经系统感染诊治中国专家共识（2021 版）[J]. 中华神经外科杂志，2021，37（1）：2-15.

[28] Tamma PD，Aitken SL，Bonomo RA，et al. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β-lactamase producing enterobacterales（ESBL-E），carbapenem-resistant enterobacterales（CRE），and pseudomonas aeruginosa with difficult-to-treat resistance（DTR-P. aeruginosa）[J]. Clin Infect Dis，2022，75（2）：187-212.

[29] 佘君，丁建文，申捷 . 成人吸入性肺炎诊断和治疗专家组 . 成人吸入性肺炎诊断和治疗专家建议 [J]. 国际呼吸杂志，2022，42（2）：86-96.

[30] 官堂明，马晓鹏 . 比阿培南与亚胺培南 / 西司他丁治疗中、重度下呼吸道感染的 Meta 分析 [J]. 中国药房，2012，23（44）：4193-4196.

[31] 刘茂昌，葛苗苗，陈渝军，等 . 美罗培南与亚胺培南 / 西司他汀治疗重症感染疗效与安全性的 Meta 分析 [J]. 中国

抗生素杂志，2014，39（10）：785-790.
[32] 蔡旭阳，金朝辉，吴斌，等 . 比阿培南与美罗培南治疗细菌性感染疗效和安全性的系统评价 [J]. 中国抗生素杂志，2019，44（8）：975-981.
[33] 马继红，王树青，赵青喜 . 美罗培南治疗老年卒中相关性肺炎疗效及安全性的 Meta 分析 [J]. 中国现代医药杂志，2021，23（4）：10-16.
[34] 肖红丽，曹邦伟，荷欢，等 . 美罗培南与亚胺培南治疗中、重度肺部感染疗效与安全性的荟萃分析 [J]. 中国感染与化疗杂志，2010，10（4）：264-269.
[35] 张翔云，赵旭，代大顺，等 . 美罗培南与亚胺培南 / 西司他丁治疗重症肺部感染的 Meta 分析 [J]. 山东医药，2018，58（22）：54-57.
[36] 周璨，王婧，苏强，等 . 2 种碳氢酶烯类抗生素对粒缺肿瘤患者伴感染治疗的 Meta 分析 [J]. 中国抗生素杂志，2014，39（7）：544-548.
[37] Tan X，Pan Q，Mo C，et al. Carbapenems vs alternative antibiotics for the treatment of complicated urinary tract infection：a systematic review and network meta-analysis [J]. Medicine（Baltimore），2020，99（2）：e18769.
[38] Chen L，Liang X，Jiang J，et al. Carbapenems vs tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections：a Bayesian network meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Medicine（Baltimore），2019，98（40）：e17436.
[39] 陈杨，修清玉，方正，等 . 注射用比阿培南治疗呼吸系统、泌尿系统细菌感染的随机对照多中心临床研究 [J]. 第二军医大学学报，2014，35（4）：388-393.
[40] 马晓华，杜书章，张晓坚，等 . 比阿培南治疗呼吸系统和泌尿系统细菌性感染疗效和安全性的 Meta 分析 [J]. 医药导报，2014，33（9）：1232-1237.
[41] 王红芳，韩洪利，王明霞，等 . 比阿培南等抗生素诱导铜绿假单胞菌释放内毒素的实验性研究 [J]. 河北师范大学学报（自然科学版），2014，38（4）：395-401.

（收稿日期：2022-10-01；修回日期：2022-12-08）

口服华法林患者合并疼痛的药学监护路径

秦琼[1]，薛领[1]，谢诚[1]，丁英龙[2]，缪丽燕[1*]（1. 苏州大学附属第一医院 药学部，江苏 苏州 215006；2. 苏州大学附属第一医院 心脏大血管外科，江苏 苏州 215006）

摘要：临床药师从药物间相互作用、华法林基因型、用药依从性等方面进行分析，实施药学监护，与临床达成口服华法林患者合并镇痛药物的用药监护共识。临床药师应深入了解华法林与镇痛药物间的相互作用，结合患者具体情况，开展个体化的药学监护。

关键词：华法林；镇痛药物；药物相互作用；药学监护
中图分类号：R969 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)07-1962-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.044

疼痛是心脏外科手术术后最常见的并发症之一，它会导致血压升高、尿潴留、肺部感染等各种危险情况的发生[1]。心脏外科术后疼痛点一般比较规律，多数患者疼痛点在胸腔切口处，也有部分患者在胸膜、双侧肩背部等。患者术后体内需留置一些管道，如气管插管，拔出后，随着时间推移，表现为持续性疼痛[2]。专家共识推荐患者采用多模式镇痛方案，以达到最佳的镇痛效果和最小的不良反应，即非选择性非甾体抗炎药（non-steroid anti-inflammatory drugs，NSAIDs）为术后镇痛基础用药，尽量减少阿片类药物的使用，以减少阿片类药物引起的不良反应如肠麻痹等[3]。华法林是心脏瓣膜术后抗凝治疗的首选药物，由于华法林经过肝脏代谢，且与蛋白高度结合，特别容易发生药物相互作用。此外，华法林治疗窗口狭窄存在引发出血或血栓的风险。因此，华法林与镇痛药物的相互作用很重要，但是尚未得到临床充分重视。

我们对华法林与镇痛药物相互作用的文献进行了系统回顾，重点关注通过细胞色素 P450 系统和蛋白结合介导的相互作用。研究发现[4]，华法林联合 NSAIDs，在联合用药后第 1、2 和 3 周时国际标准化比值（INR）较联合用药前分别平均增加 13%、6% 和 5%。我院心外科术后患者

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81803628）；苏州市科技计划民生科技项目（No.SYSD2020179）；江苏省药学会科研项目资助项目（No.H202023）；江苏省研究型医院学会精益化用药科研基金（No.JY202025）；教育部重点实验室开放课题（No.KFJJ-2021-16）。
作者简介：秦琼，女，博士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：q-q2456@163.com *通信作者：缪丽燕，女，教授，主任药师，博士研究生导师，主要从事医院药学工作，email：miaolysuzhou@163.com

在常规予华法林抗凝治疗后合并使用双氯芬酸钠而导致药物相互作用，引起临床药师和医护的关注，引发了关于口服华法林患者合并疼痛能否使用镇痛药物的分析与讨论，并在深入学习、循证导向、充分交流的基础上达成华法林合并镇痛药物应用的科内共识，现汇总分析如下，以供其他医疗机构参考借鉴。

1 药学监护实例

1.1 华法林合并双氯芬酸钠缓释胶囊的用药监护

患者，男，63 岁，因发现凝血酶原时间延长 1 d，于 2021 年 5 月 7 日入院。患者于 2 个月前在我院诊断为主动脉夹层，2021 年 3 月 22 日在全麻下行主动脉瓣人工血管升主动脉替换术。3 月 28 日，予华法林 2.5 mg 和 3.125 mg 交替，po qd 抗凝治疗。华法林基因型为 AA/AA。2021 年 4 月 16 日，出凝血常规查 INR 2.37，已达标，予出院。患者既往因心房扑动，行房扑射频消融术，术后患者心率转为窦性心率。有吸烟史，40 支 • d^{-1}，40 年，已戒烟 2 年；有饮酒史，白酒 300 mL • d^{-1}。家族史无特殊。

体格检查：体温 36.5 ℃，心率 50 次 • min^{-1}，呼吸 18 次 • min^{-1}，血压 96/44 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa），胸部正中可见长约 30 cm 手术瘢痕，余未见异常。实验室检查：血凝常规示 INR 6.88，血常规示血红蛋白 74 g • L^{-1}（参考值：130 ～ 175 g • L^{-1}），红细胞计数 2.59×10^{12} • L^{-1} [参考值：（4.3 ～ 5.8）$\times10^{12}$ • L^{-1}]，无出血症状。回顾患者用药史，2021 年 4 月 21 日，患者自行购买双氯芬酸钠缓释胶囊 50 mg po qd 治疗疼痛。治疗期间华法林剂量同前，饮食习惯、其他用药无变化。入院后停用华法林和双氯芬酸钠，予维生素 K_1 注射液 10 mg 和红细胞 2 个单位静脉滴注治疗后，复查 INR 1.96。入院后第 3 日，查 INR 1.29，重启华法林 2.5 mg 与 1.875 mg 交替 po qd 抗凝治疗。出院后，复查 INR 2.36，在目标范围内，期间无出血症状。

研究显示[5-6]，口服华法林患者应避免使用 NSAIDs。选择性 COX-2 抑制剂分为倾向性 COX-2 抑制剂（美洛昔康、尼美舒利和双氯芬酸等）和特异性 COX-2 抑制剂（塞来昔布、罗非昔布、伐地考昔、依托考昔等）。选择性 COX-2 抑制剂的主要不良反应为消化道溃疡、穿孔或出血、凝血功能障碍，以及血栓形成等，其机制与同时抑制 COX-1 和 COX-2，减弱其对消化道黏膜的保护作用、抑制 CYP2C9 酶活性而降低华法林代谢率以及影响血栓素 A_2 和前列腺素 I_2 的平衡等有关[7-8]。双氯芬酸钠在体内主要通过抑制 CYP2C9 酶活性，影响华法林的药动学，降低华法林代谢，使华法林的抗凝作用更加显著，增加出血风险。提示临床药师应该重点关注华法林与 NSAIDs 的相互作用。

1.2 华法林合并双氯芬酸二乙胺乳胶剂的用药监护

患者，男，65 岁，患者因二尖瓣脱垂伴关闭不全，于 2021 年 4 月 7 日行二尖瓣生物瓣膜置换术＋三尖瓣成形术。2021 年 4 月 9 日（D1），术后常规予华法林 3.125 mg 和 3.75 mg 交替，po qd 抗凝治疗。4 月 29 日（D20），查 INR 2.32。5 月 7 日（D28），患者因右上肢疼痛，自行购买双氯芬酸二乙胺乳胶剂，1 g tid，涂抹治疗。治疗期间华法林剂量同前，饮食习惯、其他用药无变化。5 月 9 日（D30），复查 INR 4.11，无出血症状，停用华法林和双氯芬酸二乙胺乳胶剂。5 月 10 日（D31），复查两次 INR 分别为 3.22 和 3.02，5 月 11 日（D32），重启华法林 2.5 mg po qd 抗凝治疗。2021 年 6 月 14 日（D67）复查 INR 1.88，在目标范围内，期间无出血症状。患者 INR 时间变化曲线见图 1。

图 1 患者 INR 时间变化曲线

双氯芬酸二乙胺乳胶剂对急慢性炎症反应和组织损伤导致的疼痛有良好的消炎镇痛作用。双氯芬酸二乙胺乳胶剂，采用异丙醇和丙二醇组合作为透皮吸收促进剂，主要作用的部位为皮肤浅表层，而浅表层含有较多的外周神经和中枢神经感受器，通过其良好的透皮性，能迅速缓解患者疼痛，避免口服 NSAIDs 对胃肠道的影响[9]。国内学者报道过华法林与外用抗真菌药物合用引起皮下出血 1 例，主要考虑华法林与环吡酮胺乳膏的相互作用，未见华法林与双氯芬酸二乙胺乳胶剂相互作用的报道[10]。提示临床药师应关注双氯芬酸二乙胺乳胶剂与华法林相互作用。

2 讨论

2.1 关于心外科术后患者镇痛药物合理应用的思考

研究显示，58% 的开胸手术患者出院后 1 个月仍有中至重度疼痛[4]。心外科术后镇痛药物有吗

啡、曲马多、塞来昔布、吲哚美辛、对乙酰氨基酚、氟比洛芬酯、双氯芬酸钠等，如缓释片、缓释胶囊和乳胶剂，这些药物均与华法林有不同程度的相互作用[5]。其中，NSAIDs 与华法林相互作用机制主要表现为以下两个方面[11-13]：一方面由于两药都是经细胞色素 P450 2C9（CYP2C9）代谢，部分 NSAIDs 可能竞争代谢酶，导致华法林代谢受阻，游离华法林增多；另一方面由于部分 NSAIDs 也有抗血小板聚集作用，能增强华法林的抗凝作用，合用时可导致 INR 升高，显著增加出血风险。因此，服用华法林的患者应避免与 NSAIDs 同时服用[6]。此案例因缺乏用药监护导致 INR 异常升高，引发临床药师和医护关于心外科术后患者口服华法林能否使用 NSAIDs 的思考和讨论。心外科常用镇痛药物与华法林相互作用情况见表 1。

表 1 心外科常用镇痛药物与华法林的相互作用

分类	药物名称	影响程度	相关性	作用机制		临床建议	作者
				抑制华法林代谢	抑制血小板聚集		
非甾体抗炎药	塞来昔布、帕瑞昔布	增强	很可能	＋	－	避免合用	张玉杰[5]
	氟比洛芬酯	增强	高度可能	－	＋	谨慎合用	Vonbach[6]
	酮咯酸	增强	高度可能	－	＋	避免合用	Vonbach[6]
	对乙酰氨基酚	增强	很可能	＋	－	谨慎合用	Mahé[7]
	布洛芬	增强	很可能	＋	＋	谨慎合用	Kalhor[8]
	双氯芬酸	增强	可能	＋	＋	谨慎合用	黎赛[9]、Miura[10]
	吲哚美辛	增强	可能	－	＋	避免合用	Vonbach[6]
	阿司匹林	增强	很可能	＋	－	谨慎合用	Dentali[14]
阿片受体激动剂	吗啡	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
	芬太尼	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
	舒芬太尼	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
	羟考酮	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
阿片受体部分激动剂	丁丙诺啡	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
	布托诺菲	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
	纳布啡	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
	地佐辛	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
非阿片类中枢性镇痛药	曲马多	增强	很可能	＋	－	谨慎合用	Veltri[15]
NMDA 受体拮抗剂	氯胺酮	－	－	－	－	可以合用	无相关报道
钙通道调节剂	加巴喷丁、普瑞巴林	－	－	－	－	可以合用	无相关报道

2.2 关于心外科术后患者华法林用药的思考

华法林的有效性和安全性同其抗凝效应密切相关，而剂量 - 效应关系在不同个体有很大差异，因此，必须密切监测 INR，防止过量或剂量不足。影响华法林抗凝作用的因素很多[16-17]，① 疾病因素：化疗、发热、甲状腺功能亢进和长期腹泻或呕吐以及肝肾功能异常时影响华法林的抗凝作用；② 遗传因素：华法林与 CYP 2C9 的底物或抑制剂，与 CYP 3A4 的部分底物或抑制剂合用时可能会出现代谢上的相互作用，使华法林的体内代谢减慢，可导致 INR 的增高；③ 合并用药：对华法林抗凝作用的影响包括药动学和药效学相互作用，也可通过影响体内维生素 K 水平来干扰凝血功能。

华法林的理想治疗效果主要取决于是否将 INR 值维持在治疗窗内，这需要在使用华法林过程中关注这些影响因素，做到及时监测和干预。临床应对患者口服华法林 INR 异常升高的原因进行分析，监护华法林抗凝治疗的有效性和安全性，提高患者抗凝治疗依从性和认知度，为进一步实施华法林个体化药学服务提供参考。

2.3 达成心外科手术后华法林合并镇痛药物监护共识

通过外科围术期疼痛管理相关指南和文献的复习[3，18]，经临床药师与心外科医护共同商讨，初步达成科内共识：① 根据疼痛性质选择镇痛药物，推荐与华法林无相互作用的阿片类药物（吗啡、芬太尼、舒芬太尼、羟考酮、地佐辛）和其他镇痛药物（氯胺酮、加巴喷丁和普瑞巴林）作为首选药物，具体监护路径，见图 2。② NSAIDs 与华法林有不同程度的相互作用，不宜作为首选药物。③ 对于接受华法林治疗的患者，在开始或停止使用镇痛药物时，或对接受稳定剂量的镇痛药物的患者开始合并华法林时，应密切监测 INR。当 INR ＞ 3.0 时，可考虑停用 / 减少华法林剂量并增加 INR 监测频次。④ 研究提示患者用华法林治疗使 INR 稳定后加用曲马多治疗，严重不良反应平均发生时间为 4 d，故建议合用期间，INR 监测频次为每周二次。⑤ 对于出院后口服华法林患者应加强出院用药教育，只有在医师或者药师的监护下增加或减少一种药物才是安全的。

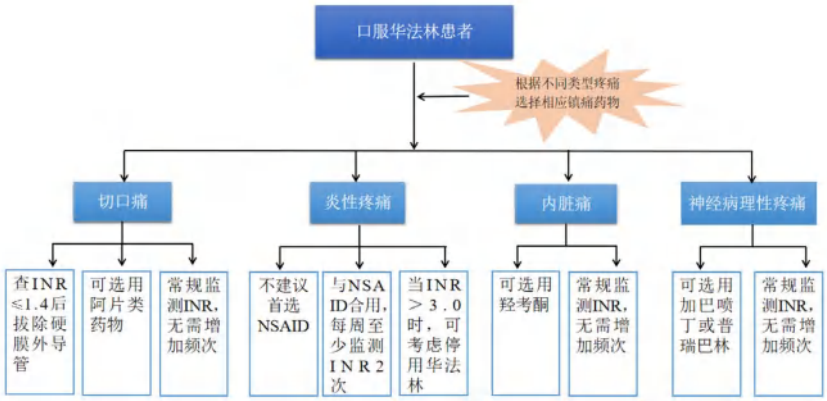


图 2　口服华法林患者合并疼痛的药学监护路径

3　小结

心外科患者的疼痛管理是一项复杂的工作，涵盖了患者术前、术中和术后多个阶段，尤其是口服华法林患者合并疼痛治疗，医药护团队可承担全程用药监护工作，并规范用药监护路径。考虑到这些相互作用的临床意义，接受镇痛药物治疗的患者需要抗凝时，可能需要选择与华法林相互作用少的镇痛药物。此外，应该密切监测有无出血症状，同时确保 INR 保持在治疗范围内，达到有效的抗凝强度。

参考文献

[1] 上海市医学会麻醉科专科分会，上海市医学会普通外科专科分会 . 普通外科围手术期疼痛管理上海专家共识（2020 版）[J]. 中国实用外科杂志，2021，41（1）：31-37.

[2] 中华医学会胸心血管外科学分会胸腔镜外科学组，中国医师协会胸外科医师分会微创外科专家委员会 . 中国胸外科围手术期疼痛管理专家共识（2018 版）[J]. 中国胸心血管外科临床杂志，2018，25（11）：921-928.

[3] Vahanian A，Beyersdorf F，Praz F，et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease [J]. Eur Heart J，2022，43（7）：561-632.

[4] Maxwell C，Nicoara A. New developments in the treatment of acute pain after thoracic surgery [J]. Curr Opin Anaesthesiol，2014，27（1）：6-11.

[5] 张玉杰，杨建东，林升元，等 . 华法林合并脊柱外伤致脊髓外硬膜下血肿 1 例 [J]. 中国矫形外科杂志，2021，29（8）：766-768.

[6] Vonbach P，Reich R，Moll F，et al. Risk factors for gastrointestinal bleeding：a hospital-based case-control study [J]. Swiss Med Wkly，2007，137（49-50）：705-710.

[7] Mahé I，Bertrand N，Drouet L，et al. Interaction between paracetamol and warfarin in patients：a double-blind，placebo-controlled，randomized study [J]. Haematologica，2006，91（12）：1621-1627.

[8] Kalhor HR，Taghikhani E. Probe into the molecular mechanism of ibuprofen interaction with warfarin bound to human serum albumin in comparison to ascorbic and salicylic acids：allosteric inhibition of anticoagulant release [J]. J Chem Inf Model，2021，61（8）：4045-4057.

[9] 黎赛，郑萍 . 1 例口服华法林患者 PT-INR 异常升高的病例分析和药学监护 [J]. 中南药学，2016，14（12）：1376-1379.

[10] Miura T，Uehara S，Shimizu M，et al. Different roles of human cytochrome P450 2C9 and 3A enzymes in diclofenac 4'-and 5-hydroxylations mediated by metabolically inactivated human hepatocytes in previously transplanted chimeric mice [J]. Chem Res Toxicol，2020，33（2）：634-639.

[11] Villa ZL，Hansten PD，Panic J，et al. Risk of bleeding with exposure to warfarin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs：a systematic review and meta-analysis [J]. Thromb Haemost，2020，120（7）：1066-1074.

[12] Dalgaard F，Mulder H，Wojdyla DM，et al. Patients with atrial fibrillation taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oral anticoagulants in the ARISTOTLE trial [J]. Circulation，2020，141（1）：10-20.

[13] Huang WC，Wang MT，Lai TS，et al. Nephrotoxins and acute kidney injury-the consensus of the Taiwan acute kidney injury Task Force [J]. J Formos Med Assoc，2022，121（5）：886-895.

[14] Dentali F，Douketis JD，Lim W，et al. Combined aspirin-oral anticoagulant therapy compared with oral anticoagulant therapy alone among patients at risk for cardiovascular disease：a meta-analysis of randomized trials [J]. Arch Intern Med，2007，167（2）：117-124.

[15] Veltri KT，Olsufka WA. Bleeding and elevated INR secondary to concomitant tramadol and warfarin administration [J]. P T，2019，44（9）：546-548.

[16] Hedenmalm K，Lindh J D，Juliette Säwe，et al. Increased liability of tramadol-warfarin interaction in individuals with mutations in the cytochrome P450 2D6 gene [J]. Eur J Clin Pharmacol，2004，60（5）：369-372.

[17] 中华医学会心血管病学分会，中国老年学学会心脑血管病专业委员会 . 华法林抗凝治疗的中国专家共识 [J]. 中华内科杂志，2013，52（1）：76-82.

[18] 急诊创伤疼痛管理共识专家组 . 急诊创伤疼痛管理专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志，2022，31（4）：436-441.

（收稿日期：2022-12-10；修回日期：2023-02-05）

药品不良反应

基于 FAERS 对 3 种 JAK 抑制剂相关主要心血管不良事件及恶性肿瘤不良事件的真实世界研究

舒家华[1, 2]，李国兴[1, 2]，向秋林[1, 2]，陈松[1, 2]，余娴[1*]（1. 重庆医科大学附属第二医院Ⅰ期临床试验中心，重庆 400010；2. 重庆医科大学药学院，重庆 400016）

摘要：目的 挖掘和评价 Janus 激酶（JAK）抑制剂的主要心血管不良事件（MACE）、恶性肿瘤有关的具体药物不良事件（ADE）信号，为临床合理用药提供参考。**方法** 提取美国食品药品管理局不良事件报告系统数据库中 3 种 JAK 抑制剂（托法替尼、巴瑞替尼、乌帕替尼）从上市以来至 2022 年第一季度的 MACE 和恶性肿瘤有关的 ADE 数据，使用医学活动监管词典（Med DRA）的标准 Med DRA 查询确定首选术语（PT），并采用英国药品和保健品管理局的综合标准法及报告比值比法对心血管、恶性肿瘤 ADE 进行信号挖掘。**结果** 共检测出与托法替尼、巴瑞替尼和乌帕替尼目标 ADE 有关的阳性信号 148 例、128 例和 200 例。女性发病人数均多于男性，多发于 18 ～ 65 岁年龄段，结局主要以住院或住院时间延长为主。3 种 JAK 抑制剂共检测出 51 种 PT 信号，托法替尼、巴瑞替尼和乌帕替尼的目标 PT 分别检出 18 种、20 种和 20 种。信号分析显示，在 MACE 方面，托法替尼可能与增加患者发生肥厚性心脏病的风险存在关联；巴瑞替尼的剂量与目标患者的 MACE 发生率成正相关；乌帕替尼暂不能确定与 MACE 存在关联。在恶性肿瘤方面，暂不能确定所报告的与恶性肿瘤有关的 ADE 与 3 种 JAK 抑制剂存在关联。**结论** 基于 3 种 JAK 抑制剂在真实世界不良事件的研究，提示临床医务人员在使用时应注意观察该类药物可能的与 MACE 和恶性肿瘤相关的药物不良反应。

关键词：JAK 抑制剂；主要心血管不良事件；恶性肿瘤不良事件；信号挖掘
中图分类号：R994.1 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)07-1966-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.045

Real-world study of major cardiovascular adverse events and malignancy adverse events associated with 3 JAK inhibitors based on FAERS

SHU Jia-hua[1, 2], LI Guo-xing[1, 2], XIANG Qiu-lin[1, 2], CHEN Song[1, 2], YU Xian[1*] (1. *Department of Phase I Clinical Trial Center*, *The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*, *Chongqing* 400010; 2. *College of Pharmacy*, *Chongqing Medical University*, *Chongqing* 400016)

Abstract: Objective To mine and evaluate Janus kinase (JAK) inhibitors with major adverse cardiovascular events (MACE) and malignancy-related adverse drug events (ADE) signals to provide a reference for rational clinical use. **Methods** The MACE and malignancy-related ADE data of the 3 JAK inhibitors (tofacitinib, baricitinib, and upadacitinib) from the U. S. Food Drug Administration adverse event reporting system database since their launch until the first quarter of 2022 were collected with the Medical Dictionary for Regulatory Activities (Med DRA) 's standardized Med DRA query (SMQ) to identify preferred terms (PT). The UK Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency's combined standard method and reporting ratio method were used for cardiovascular and

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.82072327）；重庆医科大学附属第二医院“宽仁英才”项目基金（No.kryc-gg-2209）。
作者简介：舒家华，男，硕士，主要从事临床药学工作，email：2955540369@qq.com *通信作者：余娴，女，教授，主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学及药物早期临床研究，email：303671@cqmu.edu.cn

malignancy ADEs for signal detection. **Results**　Totally 148 cases, 128 cases and 200 cases of positive signals related to target ADE of tofacitinib, baricitinib and upadacitinib were detected. Women had higher incidences than men, mostly in the 18 ～ 65 year old, and the outcomes were mainly hospitalization or prolonged hospitalization. Totally 51 PT were detected for the 3 JAK inhibitors; 18, 20 and 20 target PT were detected for tofacitinib, baricitinib and upadacitinib, respectively. Signal analysis showed that in terms of MACE, tofacitinib might be associated with an increased risk of hypertrophic heart disease in patients; the dose of baricitinib was positively correlated with the incidence of MACE in target patients; and no association with MACE was established at this time for upadacitinib. For malignancy, the association between the reported ADEs associated with malignancy and the 3 JAK inhibitors was not determined at this time. **Conclusion**　Based on study of real-world adverse events with the 3 JAK inhibitors, clinical staff should be aware of the possible MACE-and malignancy-related adverse drug reactions associated with these drugs.

Key words: JAK inhibitor; major adverse cardiovascular events; malignantcy; adverse drug event; signal mining

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以持续性的关节损伤为特征的慢性全身性免疫系统疾病，主要临床表现为侵蚀性关节炎，并常常累及关节以外的器官或系统[1]。近年来，随着抗细胞因子单克隆抗体、针对细胞靶点的单克隆抗体和小分子抑制剂的不断问世和应用，诸如 RA 等由免疫介导的炎症性疾病（immune-mediated inflammatory diseases，IMID）的药物治疗发展迅速，其中 Janus 激酶（Janus kinase，JAK）抑制剂就是小分子抑制剂中治疗 IMID 的典型代表。JAK 抑制剂是一种口服的靶向合成的改善病情抗风湿病药物（disease modifying antirheumatic drugs，DMARDs），它具有与生物制剂 DMARDs 相当的疗效和相似的安全性。越来越多的研究表明，Janus 激酶 - 信号转导及转录激活因子（Janus kinase-signal transducer and activators of transcription，JAK-STAT）通路中的配体通过与其相应受体结合，激活胞质内的 JAK 激酶，活化的 JAK 激酶进一步收集胞浆内相应的信号传导，同时使特定的 STAT 蛋白磷酸化，磷酸化的 STAT 蛋白间形成二聚体并与细胞核内的目的基因结合，参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等重要生理过程[2-4]。JAK-STAT 通路中功能蛋白的失调与自身免疫性疾病和肿瘤的发生有关，而 JAK 抑制剂可以通过 JAK 激酶磷酸化，阻断 JAK-STAT 通路从而发挥抗炎及免疫调节的作用。

目前，国内外已有多种用于治疗 RA 的 JAK 抑制剂上市，包括托法替尼、巴瑞替尼、乌帕替尼等。其中托法替尼的仿制药托法替布和巴瑞替尼分别于 2017 年 3 月和 2019 年 6 月在我国获批上市，可用于治疗甲氨蝶呤疗效不足或对其无法耐受的中度至重度活动性 RA 成年患者；乌帕替尼也于 2022 年 2 月在我国正式获批，可用于治疗一种或多种肿瘤坏死因子抑制剂应答不佳或不耐受的中重度活动性 RA 成年患者。对于其他的 IMID，如特应性皮炎、溃疡性结肠炎、银屑病、系统性红斑狼疮、克罗恩病等，上述 JAK 抑制剂亦有良好的疗效。然而，Ytterberg 等[5]进行的大型随机对照试验表明，在中位数为 4.0 年的 RA 患者随访期间，与肿瘤坏死因子抑制剂相比，合并使用 5 mg 或 10 mg 托法替尼剂量的主要不良心血管事件（major adverse cardiovascular events，MACE）和癌症的发生率显著增加，比值比分别为 1.33（0.91 ～ 1.94）和 1.48（1.04 ～ 2.09）。因此 FDA 在 2021 年 12 月发布黑框警告，提醒托法替尼可导致严重心脏相关问题和癌症风险增加，紧接着加拿大卫生部也发出了类似声明[6-7]。此外，FDA 还对同类 JAK 抑制剂巴瑞替尼和乌帕替尼也提出了类似警告[8]，但国内外说明书中均未对使用该药后引起的具体 MACE 与瘤种作进一步解释与说明，这无疑会对临床医务工作者拟定具体治疗方案、施行药物不良反应监护带来困难。基于以上背景，本研究采用美国食品药品监督管理局不良事件报告系统（Food Drug Administration Adverse Event Reporting System，FAERS）数据库，收集 3 种治疗 RA 的 JAK 抑制剂的 MACE 及恶性肿瘤有关的 ADE 数据进行信号挖掘，深入探究 3 种 JAK 抑制剂的具体 MACE 和恶性肿瘤相关瘤

种，评价目标药物在真实世界中的安全性特征，以期为国内临床合理使用 JAK 抑制剂提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源

FAERS 是一个自发呈报数据库（spontaneous reporting systems，SRS），该数据库收集 ADE 报告的信息量大，是支持 FDA 用于监测在美国批准上市的药物和生物制品的 ADE 数据库。FAERS 的数据源是公开的，收集的数据包括患者人口学信息、药物信息、合并用药以及患者转归等信息[9]。在 FAERS 数据库的 ADE 报告中，上报人员提交的每份报告都有一个主要怀疑（primary suspect drug，PS）药物，一份报告可能会有 1 个或多个 ADE。本研究使用 FAERS 结构化信息工具 Open Vigil 2.1 进行数据提取，该工具可以通过应用程序接口直接从 FAERS 中提取经结构化整理的 ADE 报告信息，方法高效准确[10-11]。

1.2 数据处理

本研究通过 Drugs@FDA 限定了药物名称为“tofacitinib”“baricitinib”和“upadacitinib”[12]，收集了 3 种用于治疗 RA 的 JAK 抑制剂托法替尼、巴瑞替尼和乌帕替尼自上市以来至 2022 年第一季度的原始 ADE 信息，并将提取的文件以 CSV 的形式导入至 Microsoft Excel 2021 以供进一步计算分析。为避免其他合用药物引起的不良反应错误地归咎到目标药物上，仅纳入将目标药物选定为“PS”的报告，将目标药物选定为“次要怀疑药物（secondary suspect drug）”“伴 随（concomitant）”及“相互作用（interacting）”的排除在外。另外，FAERS 是根据《监管活动医学词典》（Medical Dictionary for Regulatory Activities，Med DRA）中的“首选术语”（preferred terms，PT）定义 ADE 名称，本研究中使用的是 Med DRA 24.0 版本中标准化 Med DRA 查询（standardized Med DRA queries，SMQ），SMQ 是经业内广泛认同的、与特定疾病相关的 PT 数据集，有狭义术语及广义术语之分[13]。为增强目标数据的特异性，本研究仅纳入与 MACE 和恶性肿瘤相关的 SMQ 狭义术语集。经手动筛选后，本研究共纳入了 5 个与 MACE 高度相关的 SMQ 术语集“ischaemic heart disease（缺血性心脏病）”“torsade de pointes/QT prolongation（尖端扭转型实性心动过速 /QT 延长）”“cardiac failure（心力衰竭）”“cardiac arrhythmias（心律失常类疾病）”“cardiomyopathy（心肌病）”和 2 个与恶性肿瘤高度相关的 SMQ 术语集“malignancies（恶性肿瘤）”和“malignant lymphomas（恶性淋巴瘤）”以用于后续分析。

1.3 计算方法

本研究采用了英国药品和保健品管理局（medicines and healthcare products regulatory agency，MHRA）的综合标准法（以下简称 MHRA 法）和报告比值比（reporting odds ratio，ROR）法两种算法分别计算了 ROR 值及 95% 置信区间（confidence interval，*CI*）、比例报告比（proportional reporting ratio，PRR）值及卡方（χ^2）值，其原理是基于 2×2 比例失衡列联表[14-15]，本研究参考文献制订了以下标准：① ROR 值＞ 2；② ROR 的 95%*CI* ＞ 1；③ PRR 值＞ 2；④ χ^2 值＞ 4；⑤ 同一 ADE 报告例数≥ 3。当报告同时满足两种算法的阈值时，则提示生成了一个阳性信号，即提示目标药物和目标 ADE 之间存在统计学关联，且信号值越高，其关联性就越强。

2 结果

2.1 ADE 报告的基本情况

根据上述方法，从 FAERS 数据库中共提取出 ADE 报告 9 849 888 份，经过清洗与整理后，PS 为托法替尼、巴瑞替尼和乌帕替尼的报告数分别为 116 071、3458 和 6558 份。经筛选后，3 种 JAK 抑制剂的目标 ADE 报告共有 476 例，其中托法替尼、巴瑞替尼和乌帕替尼的报告数分别为 148、128 和 200 份。筛选流程见图 1。从人口学分布来看，3 种 JAK 制剂的女性 ADE 报告均显著多于男性，年龄多集中于 18 ～ 65 岁区间段，结局主要以入院或住院时间延长为主。具体人口学特征情况见表 1。

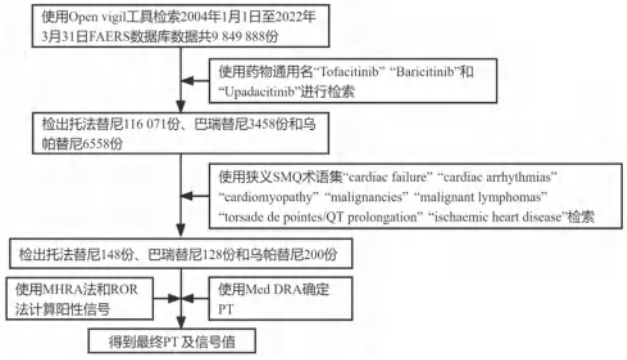


图 1 数据提取与挖掘流程图

Fig 1 Flow chart of data extraction and mining

2.2 基于目标 SMQ 狭义术语集的信号检测结果

Med DRA 目标 SMQ 狭义术语集结果显示，对于目标 SMQ 术语集层面，3 种 JAK 抑制剂均检测出了与 MACE 和恶性肿瘤相关的术语集信号，

表 1　3 种 JAK 抑制剂相关 ADE 报告的人口学信息

Tab 1　Demographic information of ADE reports related to 3 JAK inhibitors

信息	报告例数 [*n*（%）]		
	托法替尼	巴瑞替尼	乌帕替尼
总数	148（100.0）	128（100.0）	200（100.0）
年份			
2022	20（13.6）	18（14.1）	24（12.0）
2021	52（35.1）	40（31.3）	82（41.0）
2020	33（22.3）	33（25.8）	61（30.5）
2019	22（14.9）	24（18.8）	30（15.0）
2018	9（6.1）	13（10.2）	3（1.5）
2017	7（4.8）	—	—
2016	4（2.8）	—	—
2015	1（0.0）	—	—
性别			
男性	28（19.2）	38（29.8）	40（20.0）
女性	114（76.9）	81（63.5）	148（74.0）
未知	6（3.9）	9（6.7）	12（6.1）
年龄 / 岁			
0 ～ 17	4（0.3）	1（0.1）	2（1.0）
18 ～ 65	75（50.7）	55（42.8）	64（32.0）
66 ～ 79	38（25.7）	32（25.1）	29（14.5）
80 ～ 99	7（4.7）	7（5.6）	5（2.7）
未知	24（16.2）	33（26.0）	100（50.3）
结局			
死亡	3（2.3）	13（10.2）	12（6.0）
危及生命	1（0.7）	7（5.5）	1（0.1）
先天异常 / 出生缺陷	0（0.0）	0（0.0）	2（0.1）
致残	1（0.7）	1（0.8）	2（1.0）
入院或住院时间延长	13（8.7）	37（28.9）	53（26.5）
防止永久性损伤或损坏所需的干预措施（设备）	0（0.0）	1（0.8）	0（0.0）
其他	38（25.4）	34（26.6）	82（41.0）
未知	92（62.3）	35（27.3）	48（23.9）

其中托法替尼共检测出“恶性肿瘤”和“心肌病”2 种，巴瑞替尼有“恶性淋巴瘤”“恶性肿瘤”“缺血性心脏病”和“心律失常类疾病”4 种，乌帕替尼检查出“恶性淋巴瘤”“恶性肿瘤”和“缺血性心脏病”3 种。具体到数量，3 种药物的“恶性肿瘤”SMQ 术语集中的可疑信号数量远大于其他 SMQ 术语集。具体见表 2 ～ 4。

2.3　基于 PT 术语的信号检测结果

在 FAERS 数据库中，3 种 JAK 抑制剂共检测出 51 种 PT 信号，分别检出托法替尼、巴瑞替尼和乌帕替尼的 PT 信号 18 种、20 种和 20 种。具体到各个药物，托法替尼与 MACE 相关 SMQ 术语集仅纳入了“肥厚性心肌病”1 个信号；另外“胆囊息肉”与“恶性息肉”的信号值相较于其他 PT 术语较高；巴瑞替尼检测出“恶性淋巴瘤”“恶性肿瘤”“缺血性心脏病”和“心律失常类疾病”4 种 SMQ 术语集，其中托法替尼和巴瑞替尼同时检出了“肺腺癌”和“淋巴增生疾病”2 个信号，巴瑞替尼和乌帕替尼同时检出了“皮肤鳞状细胞癌”“淋巴瘤”“基底细胞癌”和“鳞状细胞癌”4 个信号。值得注意的是，巴瑞替尼 PT“乳腺小管癌”的信号值远高于其他 PT，且“恶性淋巴瘤”的 2 个信号均与“恶性肿瘤”重复；同样的，乌帕替尼“恶性淋巴瘤”信号也与“恶性肿瘤”重复。具体见表 2 ～ 4。

3　讨论

对于 JAK 抑制剂是否增加 MACE 的风险这一问题，虽然此前有研究报道托法替尼的Ⅱ/Ⅲ期的试验表明与 MACE 之间无联系 [16-18]，但也有研究表明，在有心血管危险因素的 RA 患者中，使用托法替尼与增加心血管结局风险存在关联。值得注意的是，最近有研究认为这可能是由于全身性炎症在加速动脉粥样硬化时引起了内皮功能紊乱 [19-20]。在本研究中，托法替尼检测出了 16 例“肥厚性心肌病”信号，这从真实世界的角度提示托法替尼可能与增加患者发生肥厚性心肌病的风险存在关联。最近，欧洲药品管理局药物警戒风险评估委员会建议，对于 65 岁以上的患者、目前或过去吸烟的患者、有其他心血管风险因素的患者以及有其他恶性肿瘤风险因素的患者，只有在没有合适的替代治疗方法的情况下，才考虑使用托法替尼 [21]。基于以上结果，我们建议在使用托法替尼时应仔细评估患者的心血管风险，降低患者发生 MACE 的风险。对于巴瑞替尼，本研究检测出了“急性心肌梗死”“缓慢性心律失常”和“无脉性电活动”信号，这些均是与 MACE 高度相关的阳性信号。在一项长期暴露试验中，有 9 名接受了巴瑞替尼治疗的患者发生了 MACE，其中有 2 名服用 2 mg 的巴瑞替尼，7 名服用 4 mg 的巴瑞替尼，且这一结果后来被一项荟萃分析所证实，表明巴瑞替尼的剂量与 RA 患者的 MACE 发生率成正相关 [22-23]。因此在应用巴瑞替尼时，建议医务人员应仔细评估患者的心血管风险情况，必要时应考虑减少使用剂量。而对于乌帕替尼，一项关于乌帕替尼的头对头试验中发现，采用乌帕替尼治疗与安慰剂或其他 DMARDs 相比，发生 MACE 的风险是相当的。在本研究中仅发现有“冠脉支架植入”1 个信号，与该试验的结果基本符合。事实上，大多数 RA 患者至少有 2 个心血管危险因素，包括高血压、糖尿病和吸烟 [24]。

表 2 托法替尼信号检测结果

Tab 2 Signal detection of tofacitinib

SMQ 术语集	PT	PRR 值	χ^2 值	ROR 值	95%*CI* 下限	例数
恶性肿瘤	胆囊腺癌	50.896	330.718	50.902	24.813	11
恶性肿瘤	恶性息肉	23.135	156.092	23.137	11.676	10
恶性肿瘤	眶后肿瘤	13.302	20.306	13.303	4.006	3
恶性肿瘤	肠腺癌	5.912	11.125	5.912	2.160	4
恶性肿瘤	耳肿瘤	5.217	12.441	5.217	2.126	5
恶性肿瘤	耳部恶性肿瘤	5.676	10.490	5.676	2.076	4
恶性肿瘤	喉肿瘤	4.893	8.386	4.893	1.796	4
恶性肿瘤	甲状腺髓样癌	4.730	7.948	4.730	1.737	4
恶性肿瘤	眼内黑素瘤	4.528	7.409	4.529	1.665	4
心肌病	肥厚性心肌病	2.724	15.373	2.725	1.659	16
恶性肿瘤	肺腺癌	2.382	20.616	2.382	1.638	28
恶性肿瘤	皮肤神经内分泌癌	2.793	9.523	2.793	1.491	10
恶性肿瘤	梭形细胞肉瘤	4.695	5.165	4.695	1.477	3
恶性肿瘤	淋巴增生疾病	2.141	14.988	2.141	1.463	27
恶性肿瘤	肛门鳞状细胞癌癌	4.561	4.922	4.561	1.436	3
恶性肿瘤	支气管转移性癌	4.497	4.806	4.497	1.416	3
恶性肿瘤	浸润性小叶乳腺癌	3.244	5.496	3.245	1.333	5
恶性肿瘤	转移性小细胞肺癌	3.326	4.237	3.326	1.229	4

表 3 巴瑞替尼信号检测结果

Tab 3 Signal detection of baricitinib

SMQ 术语集	PT	PRR 值	χ^2 值	ROR 值	95%*CI* 下限	例数
恶性肿瘤	乳腺小管癌	923.994	1476.725	924.860	254.410	3
恶性肿瘤	肺腺癌	31.627	351.965	31.752	18.365	13
恶性肿瘤	胃腺癌	43.228	123.733	43.281	16.123	4
恶性肿瘤	支气管癌	31.752	89.440	31.791	11.864	4
心律失常类疾病	无脉性电活动	15.751	136.889	15.802	8.729	11
恶性肿瘤	结肠腺癌	21.538	58.734	21.564	8.061	4
恶性肿瘤	淋巴增生疾病	13.558	57.550	13.582	6.086	6
恶性肿瘤	浸润性导管乳腺癌	14.825	38.487	14.843	5.554	4
心律失常类疾病	缓慢型心律失常	12.353	20.893	12.364	3.976	3
恶性淋巴瘤	皮肤 T 细胞淋巴瘤	11.351	18.842	11.361	3.655	3
恶性肿瘤	皮肤 T 细胞淋巴瘤	11.351	18.842	11.361	3.655	3
恶性肿瘤	腹膜转移	10.633	17.373	10.642	3.424	3
恶性肿瘤	皮肤鳞状细胞癌	6.216	12.655	6.222	2.332	4
缺血性心脏病	急性心肌梗死	3.673	28.512	3.686	2.255	16
恶性淋巴瘤	淋巴瘤	4.074	20.206	4.083	2.194	10
恶性肿瘤	淋巴瘤	4.074	20.206	4.083	2.194	10
恶性肿瘤	肝转移	4.153	18.496	4.162	2.163	9
恶性肿瘤	肝细胞癌	4.807	14.468	4.815	2.160	6
恶性肿瘤	基底细胞癌	3.979	12.763	3.985	1.897	7
恶性肿瘤	鳞状细胞癌	3.935	8.198	3.939	1.638	5

因此，我们建议有心血管病既往史的 RA 患者谨慎用药。

“恶性肿瘤”是本研究中出现最多的目标 SMQ 术语集。在托法替尼和巴瑞替尼中，出现与恶性肿瘤有关的信号次数最多的为肺腺癌，分别有 28 例和 13 例。一项长达 9.5 年的安全期随访结果显示，接受托法替尼治疗的患者最常报告的恶性肿瘤也是肺癌，且在纳入的 24 名患者中，有 20 名患者目前或既往有吸烟史 [25]。其他实体瘤报告的例数大多为个位数，目前研究尚未有充分证据显示使用托法替尼和巴瑞替尼治疗的患者发生恶性肿瘤的风险显著增加 [26-27]。鉴于目前已知实体瘤的生长速度，我们怀疑这些癌症很可能在给药之前就已经存在。值得注意的是，巴瑞替尼发生“乳腺小管癌”的信号值远高于其他阳性信号，虽然报告数仅为 3 例，这也提示我们在面对患有

表 4　乌帕替尼信号检测结果

Tab 4　Signal detection of upadacitinib

SMQ 术语集	PT 术语	PRR 值	χ^2 值	ROR 值	95%*CI* 下限	例数
恶性肿瘤	外阴癌	43.483	242.977	43.531	20.537	7
恶性肿瘤	皮肤肿瘤切除	23.564	64.373	23.579	8.783	4
恶性肿瘤	胃切除术	13.587	34.604	13.595	5.080	4
恶性肿瘤	皮肤癌	6.638	194.914	6.677	4.926	42
恶性肿瘤	子宫切除	7.873	94.811	7.892	4.897	17
恶性肿瘤	甲状腺切除术	10.661	25.848	10.667	3.989	4
恶性肿瘤	化疗	8.045	36.249	8.053	3.831	7
恶性肿瘤	骨肿瘤	10.714	17.480	10.719	3.443	3
恶性肿瘤	基底细胞癌	5.314	58.628	5.326	3.351	18
恶性肿瘤	姑息疗法	9.617	15.252	9.621	3.092	3
恶性肿瘤	甲状腺乳头状癌	8.258	12.499	8.261	2.656	3
恶性淋巴瘤	淋巴瘤	4.016	40.009	4.026	2.565	19
恶性肿瘤	淋巴瘤	4.016	40.009	4.026	2.565	19
恶性肿瘤	分期未特指的舌恶性肿瘤	6.590	13.731	6.594	2.469	4
恶性肿瘤	前列腺转移性癌	5.895	15.666	5.899	2.451	5
恶性肿瘤	皮肤鳞状细胞癌	4.838	14.587	4.841	2.172	6
缺血性心脏病	冠脉支架植入	4.118	13.520	4.121	1.962	7
恶性肿瘤	鳞状细胞癌	3.266	10.392	3.269	1.633	8
恶性肿瘤	肿瘤	2.885	9.264	2.887	1.501	9
恶性肿瘤	恶性黑素瘤	2.620	9.450	2.623	1.451	11

乳腺相关疾病的患者时应更谨慎地使用巴瑞替尼。对于乌帕替尼，报告次数最多的恶性肿瘤信号为“皮肤癌”，其次为“淋巴瘤”，分别有 42 例和 19 例。国外已有服用乌帕替尼的患者中发生了非黑色素瘤皮肤癌的报道，鉴于乌帕替尼在真实世界中较高的发生率，我们建议患者定期进行皮肤相关检查。此外，有研究观察到，与一般人群相比，RA 患者发生淋巴瘤的风险增加，这可能与其免疫抑制的治疗时间或 RA 的严重程度有关[25]。综上所述，虽然数据提示所报告的与恶性肿瘤有关阳性信号可能并非由 JAK 抑制剂直接引起，但需要更多的真实世界数据来验证上述结果。

作为一类具有新作用机制的靶向合成 DMARDs，JAK 抑制剂的临床应用对传统合成 DMARDs 反应不足的患者带来了良好的治疗效果，同时也改善了患者的生活质量。随着 JAK 抑制剂的广泛应用，它们的不良反应也受到了越来越多的关注。既往报道 JAK 抑制剂的不良反应有严重感染、血脂升高、血栓形成、胃肠道穿孔等[3，16]。目前国内尚无对 JAK 抑制剂所导致的具体 MACE 和恶性肿瘤 ADE 作真实世界数据分析。本研究通过调取 FAERS 数据库中 3 种用于 RA 的 JAK 抑制剂相关 ADE 数据，并运用 ROR 法和 MHRA 法，根据挖掘的信号强度分析具体的 MACE 和恶性肿瘤 ADE 的风险情况，这为临床合理用药提供了参考依据。在 MACE 方面，对于托法替尼，应尤其关注“肥厚性心脏病”的风险信号；巴瑞替尼应重点关注“急性心肌梗死”“缓慢型心律失常”和“无脉性电活动”，应做到早发现、早治疗；高血脂患者和冠心病患者等高危患者使用乌帕替尼时应谨慎。在恶性肿瘤方面，我们应仔细评估患者在使用 JAK 抑制剂时所包含的潜在风险，避免 JAK 抑制剂成为诱发癌症的“危险因子”。

利用数据挖掘算法已广泛应用于对真实世界 SRS 的 ADE 监测，虽然 SRS 可收集较广的 ADE 报告，但需要强调的是，数据库及算法本身也存在一定的局限性：① FAERS 是一个 SRS，存在少报漏报及报告不准确的问题；② FAERS 数据库中的一些关键数据值缺失，阻碍了数据的分析；③ 由于用药人群的总体数量和使用细节不详，无法确定药物与 ADR 之间的因果关系，也无法计算 ADE 的发生率；④ 服用 JAK 抑制剂的 RA 患者可能有多种合并症，在服用 JAK 抑制剂期间可能会出现进展。因此，不可能准确评估这类 ADE 的发生是由药物引起的还是由于疾病的进展。尽管有这些局限性，使用 SRS 进行信号检测和分析来评估药物的安全性，特别是上市药物，可以帮助临床医务工作者作出有利于患者的决策，降低临床用药风险。

参考文献

[1] Smolen JS，Aletaha D，McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet，2016，388（10055）：2023-2038.

[2] McLornan DP，Pope JE，Gotlib J，et al. Current and future status of JAK inhibitors [J]. Lancet，2021，398（10302）：803-816.

[3] Clarke B，Yates M，Adas M，et al. The safety of JAK-1 inhibitors [J]. Rheumatology（Oxford），2021，60（Suppl 2）：ii24-ii30.

[4] Schwartz DM，Bonelli M，Gadina M，et al. Type Ⅰ/Ⅱ cytokines，JAKs，and new strategies for treating autoimmune diseases [J]. Nat Rev Rheumatol，2016，12（1）：25-36.

[5] Ytterberg SR，Bhatt DL，Mikuls TR，et al. Cardiovascular and cancer risk with tofacitinib in rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med，2022，386（4）：316-326.

[6] Initial safety trial results find increased risk of serious heart-related problems and cancer with arthritis and ulcerative colitis medicine Xeljanz，Xeljanz XR（tofacitinib）[DB/OL]. https：//www. fda. gov/drugs/drug-safety-and-availability/initial-safety-trial-results-find-increased-risk-serious-heart-related-problems-and-cancer-arthritis. Accessed 08.06.2022.

[7] XELJANZ/XELJANZ XR（tofacitinib）-risk of major adverse cardiovascular events，malignancy，thrombosis and infection [DB/OL]. https：//recalls-rappels. canada. ca/en/alert-recall/ xeljanzxeljanz-xr-tofacitinib-risk-major-adverse-cardiovascular-events-malignancy. Accessed 08.06.2022.

[8] FDA requires warnings about increased risk of serious heart-related events，cancer，blood clots，and death for JAK inhibitors that treat certain chronic inflammatory conditions [DB/OL]. https：//www. fda. gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-requires-warnings-about-increased-risk-serious-heart-related-events-cancer-blood-clots-and-death. Accessed 08.07.2022.

[9] FDA Adverse Event Reporting System（FAERS）[DB/OL]. https：//www. fda. gov/drugs/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers/fda-adverse-event-reporting-system-faers-latest-quarterly-data-files. Accessed 7 Feb 2022.

[10] Bohm R，Hocker J，Cascorbi I，et al. OpenVigil--free eyeballs on AERS pharmacovigilance data [J]. Nat Biotechnol，2012，30（2）：137-138.

[11] Bohm R，von Hehn L，Herdegen T，et al. OpenVigil FDA-Inspection of U. S. American Adverse Drug Events Pharmacovigilance Data and Novel Clinical Applications [J]. PLoS One，2016，11（6）：e0157753.

[12] Drugs@FDA：FDA-approved drugs [DB/OL]. https：//www. accessdata. fda. gov/scripts/cder/daf/index. cfm. Accessed 9 Feb 2022.

[13] Introductory guide for Standardised MedDRA Queries（SMQs）version 24.0 [DB/OL]. https：//admin. meddra. org/sites/default/files/guidance/file/SMQ_intguide_24_0_English. pdf. Accessed 28 Jan 2022.

[14] Bate A，Evans SJW. Quantitative signal detection using spontaneous ADR reporting [J]. Pharmacoepidem Dr S，2009，18（6）：427-436.

[15] Evans SJW，Waller PC，Davis S. Use of proportional reporting ratios（PRRs）for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports [J]. Pharmacoepidem Dr S，2001，10（6）：483-486.

[16] Cohen SB，van Vollenhoven RF，Winthrop KL，et al. Safety profile of upadacitinib in rheumatoid arthritis：integrated analysis from the SELECT phase Ⅲ clinical programme [J]. Ann Rheum Dis，2021，80（3）：304-311.

[17] Charles-Schoeman C，Burmester G，Nash P，et al. Efficacy and safety of tofacitinib following inadequate response to conventional synthetic or biological disease-modifying antirheumatic drugs [J]. Ann Rheum Dis，2016，75（7）：1293-1301.

[18] Winthrop KL，Cohen SB. Oral surveillance and JAK inhibitor safety：the theory of relativity [J]. Nat Rev Rheumatol，2022，18（5）：301-304.

[19] Khosrow-Khavar F，Kim SC，Lee H，et al. Tofacitinib and risk of cardiovascular outcomes：results from the safety of TofAcitinib in routine care patients with rheumatoid arthritis（STAR-RA）study [J]. Ann Rheum Dis，2022，81（6）：798-804.

[20] Logstrup BB，Ellingsen T，Pedersen AB，et al. Cardiovascular risk and mortality in rheumatoid arthritis compared with diabetes mellitus and the general population [J]. Rheumatology（Oxford），2021，60（3）：1400-1409.

[21] Xeljanz（tofacitinib）：increased risk of major adverse cardiovascular events and malignancies with use of tofacitinib relative to TNF-alpha inhibitors [DB/OL]. https：//www. ema. europa. eu/en/medicines/dhpc/xeljanz-tofacitinib-increased-risk-major-adverse-cardiovascular-events-malignancies-use-tofacitinib. Accessed 7 Feb 2022.

[22] Taylor PC，Weinblatt ME，Burmester GR，et al. Cardiovascular safety during treatment with baricitinib in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol，2019，71（7）：1042-1055.

[23] Xie W，Huang Y，Xiao S，et al. Impact of Janus kinase inhibitors on risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis：systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. Ann Rheum Dis，2019，78（8）：1048-1054.

[24] Fleischmann R，Mysler E，Bessette L，et al. Long-term safety and efficacy of upadacitinib or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis：results through 3 years from the SELECT-COMPARE study [J]. Rheumatic Musculoskeletal Diseases，2022，8（1）：e002012.

[25] Curtis JR，Lee EB，Kaplan IV，et al. Tofacitinib，an oral Janus kinase inhibitor：analysis of malignancies across the rheumatoid arthritis clinical development programme [J]. Ann Rheum Dis，2016，75（5）：831-841.

[26] Harrington R，Al Nokhatha SA，Conway R. JAK inhibitors in rheumatoid arthritis：an evidence-based review on the emerging clinical data [J]. J Inflamm Res，2020，13：519-531.

[27] Taylor PC，Takeuchi T，Burmester GR，et al. Safety of baricitinib for the treatment of rheumatoid arthritis over a median of 4.6 and up to 9.3 years of treatment：final results from long-term extension study and integrated database [J]. Ann Rheum Dis，2022，81（3）：335-343.

（收稿日期：2022-09-10；修回日期：2022-11-05）

呋喃唑酮致急性间质性肺疾病 1 例并文献复习

汪庆路[1]，陈圆圆[2]，陈焕芹[3]，仇先明[4*]（1. 德州市第二人民医院重症医学科，山东　德州　253000；2. 德州市第七人民医院影像医学科，山东　德州　253000；3. 山东大学齐鲁医院干部保健科，济南　250012；4. 山东第一医科大学第一附属医院RICU/MICU，济南　250014）

关键词：呋喃唑酮；药物相关性间质性肺疾病；不良反应
中图分类号：R969.3　　**文献标识码**：B　　**文章编号**：1672-2981(2023)07-1973-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.046

药物相关性间质性肺疾病（drug-induced interstitial lung disease，DILD）是一组由各种药物导致的肺间质细胞发生炎症反应进而累及肺间质纤维化病变的疾病[1]。研究发现超过 350 种药物均可导致药物相关的间质性肺疾病[2]。但由于缺少特异性的症状、影像学表现等，药物相关的间质性肺疾病往往是排除性诊断，这就给临床医师的诊疗带来了挑战。本研究对收治的 1 例呋喃唑酮导致的急性间质性肺疾病进行临床分析，以期提高临床医师对本病的认识及诊治水平。

1　临床资料

患者男，55 岁，因“全身乏力 6 h，憋喘 2 h”于 2022 年 4 月 15 日入住重症医学科。患者 6 h 前无明显诱因出现全身乏力伴发热，自测体温 38.2 ℃，无胸闷、胸痛，无咳嗽、咳痰。自服“姜糖水”后热退，仍感乏力，遂来院就诊，胸部 CT 示：间质性肺炎。急诊给予吸氧等对症治疗，症状未见明显好转。2 h 前出现憋喘，端坐呼吸。急查动脉血气分析：pH 7.384，血氧分压（PaO_2）46 mmHg↓，动脉血二氧化碳分压（$PaCO_2$）29.4 mmHg↓，乳酸 3.77 mmol·L^{-1}↑，血氧饱和度（SaO_2）82%↓。急诊给予甲强龙 80 mg 静脉滴注、二羟丙茶碱 0.5 g 静脉滴注，未见好转，以“Ⅰ型呼吸衰竭、重症肺炎？”收入重症医学科。患者既往体健，否认疾病史，吸烟 30 年，每日 30 支，偶有饮酒，每次 200 ～ 300 mL。否认毒物毒品接触史，否认鸟类、家禽类接触史。余无特殊个人史和家族史。

入院体格检查：体温 36.5 ℃，呼吸 50 次·min^{-1}，脉搏 120 次·min^{-1}，血压 60/40 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。强迫坐位，无颈静脉怒张，双肺呼吸音粗，全肺满布湿啰音。心率 120 次·min^{-1}，各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音。余查体无异常。血常规示：白细胞 28.21×10^9·L^{-1}↑，中性粒细胞百分比 95.5%↑，淋巴细胞百分比 0.8%↑，嗜酸性粒细胞百分比 3.7%↑，中性粒细胞计数 26.93×10^9·L^{-1}↑，淋巴细胞计数 0.23×10^9·L^{-1}↓，嗜酸性粒细胞计数 1.04×10^9·L^{-1}↑，血红蛋白 152 g·L^{-1}，血小板 350×10^9·L^{-1}。降钙素原 16.03 ng·mL^{-1}↑，肌酐 107 μmol·L^{-1}↑，胱抑素 C 1.27 mg·L^{-1}。电解质、心肌酶、脑钠肽（BNP）、凝血功能等无异常。给予无创呼吸机辅助呼吸。患者指脉氧饱和度逐渐升至 95% 左右。

反复追问病史，得知患者于入院前半月余因“胃炎、幽门螺杆菌感染”就诊于某诊所，予以阿莫西林、泮托拉唑联合呋喃唑酮片（云鹏医药集团有限公司，批号：F210801）0.2 g qd po。入院前 1 周余（应用该治疗方案 1 周后）出现乏力、高热伴腹泻，于外院就诊，考虑“重症社区获得性肺炎”，给予哌拉西林他唑巴坦等治疗，住院期间多次痰细菌培养、真菌培养及流感病毒筛查阴性并未再服用阿莫西林、泮托拉唑联合呋喃唑酮，好转出院。出院后继续服用上述药物，期间无高酪胺饮食，无饮酒。结合患者大剂量呋喃唑酮服药史、临床表现和辅助检查，诊断为呋喃唑酮导致的 DILD。给予补液、利尿促进药物排泄，6 h 后血气分析无异常，肺部湿啰音消失。撤离无创呼吸机，患者呼吸平稳，呼吸 18 次·min^{-1}，脉搏 90 次·min^{-1}，血压 110/80 mmHg。转至普通病房继续治疗，期间多次痰细菌培养、真菌培养及流感病毒筛查阴性，自身免疫指标等均为阴性。复查血细胞分析：白细胞 6.44×10^9·L^{-1}，中性粒细胞百分比 61.5%，淋巴细胞百分比 27.5%，嗜酸性粒细胞百分比 4.8%，中性粒细胞计数 3.97×10^9·L^{-1}，淋巴

基金项目：国家重点研发计划资助项目（No.2018YFC2002000）。
作者简介：汪庆路，男，主治医师，主要从事呼吸衰竭研究，email：wangqinglu@163.com　*通信作者：仇先明，男，主治医师，主要从事呼吸危重症研究，email：qfsqiu@126.com

细胞计数 $1.77\times10^{9}\cdot L^{-1}$，嗜酸性粒细胞计数 $0.31\times10^{9}\cdot L^{-1}$，血红蛋白 139 g·$L^{-1}$，血小板 $317\times10^{9}\cdot L^{-1}$。降钙素原 0.59 ng·$mL^{-1}$，肌酐 66 μmol·$L^{-1}$，胱抑素 C 0.96 mg·$L^{-1}$。患者好转出院。

2 文献复习

2.1 文献检索

以“呋喃唑酮、药物相关性间质性肺疾病”和“呋喃唑酮、间质性肺炎”为中文检索词检索万方数据知识服务平台和中国知网，以“furazolidone、interstitial lung disease”为英文检索词检索 PubMed，检索日期截止到 2022 年 5 月，纳入由呋喃唑酮导致肺损伤的个案报道，最终纳入文献 4 篇 [3-6]，加上本例患者，共 5 例呋喃唑酮导致 DILD 患者。

2.2 基本特征

5 例患者中男 3 例，女 2 例；年龄 43 ～ 58 岁，服药后出现 DILD 的潜伏期长短不一，均有发热表现，其次咳嗽、胸痛和呼吸困难，其中 4 例患者血细胞分析发现嗜酸性粒细胞增多，所有患者均痊愈出院（见表 1）。

表 1 4 例呋喃唑酮导致 DILD 患者的基本特征

作者	性别	年龄 / 岁	用药剂量	用药时间 /d	症状	影像学表现	治疗	预后
Cortez[3]	男	50	100 mg bid	4	发热、胸痛、呼吸困难	胸片示双侧弥漫性渗出	强的松 40 mg qd po 4 d	痊愈
Collins[4]	男	56	未知	2	发热，呼吸困难，荨麻疹和嗜酸性粒细胞增多	胸片示肺弥漫性浸润	停药	痊愈
Kowalski[5]	女	43	125 mg q6h	10	发热、咳嗽、呼吸困难、胸痛和头痛和嗜酸粒细胞增多	胸片示双侧下肺野和左肺门周围间质浸润	停药＋强的松 40 mg qd po	痊愈
王丽芳 [6]	女	58	未知	10	发热、干咳和嗜酸性粒细胞增多	胸部 CT 可见两肺小叶间隔增厚，左侧胸腔少量积液，纵隔淋巴结不大	停药＋甲泼尼龙片 12 mg qd po	痊愈

3 讨论

DILD 是药物性肺损伤中的常见不良反应，多种药物均可导致 DILD，常见的包括抗肿瘤药物、抗风湿药物、抗菌药物、非甾体抗炎药和抗心律失常药物等 [2]。DILD 的发病机制尚不明确，目前认为其发病机制主要有免疫损伤、氧化应激、细胞因子释放、药物直接细胞毒性及肺泡修复受损致间接细胞毒性等方面 [7]。DILD 患者临床表现相似，多表现为发热、咳嗽、呼吸困难和低氧血症，缺乏特异性症状，因此诊断困难。DILD 的诊断属于排除性诊断，需明确患者用药史、用药剂量、疗程、临床表现与服药的先后关系。部分患者停药后会自行好转，再次用药后疾病复发。高分辨率 CT 有助于诊断 DILD，但目前研究发现其准确率仅有 45%[8]。Inomata 等 [9] 发现在吉非替尼相关的 DILD 患者中血浆肺表面活性物质 A（SP-A）、肺表面活性物质 D（SP-D）和涎液化糖链抗原（KL-6）水平明显增高。同时，对于药物导致的嗜酸性粒细胞肺炎，患者血浆去整合素和金属蛋白酶域 -8（ADAM8）浓度明显增高，且与肺的炎症反应成相关变化 [10]。但这些血清标志物对于 DILD 的诊断尚未进入临床应用。

经询问，患者在服用呋喃唑酮治疗幽门螺杆菌过程中出现发热、咳嗽和呼吸困难，期间于外院考虑“肺炎”，停用相关药物联合抗感染及对症支持后好转，出院后继续口服呋喃唑酮后再次出现上述症状，入我院后胸部 CT 提示弥漫性肺间质改变，否认其他疾病史，进一步筛查痰细菌培养和真菌培养、血培养和病毒均为阴性，自身免疫指标筛查阴性，排除感染性疾病、自身免疫性疾病、心力衰竭及其他类型间质性肺疾病后；且中间停用药物后一度出现症状好转，再次应用后出现症状加重，本例患者诺氏评分 7 分（见表 2）。尽管阿莫西林引起药物超敏反应综合征可累及肺部，但本研究病例不符合药物超敏反应综合征的诊断标准：① 迅速出现皮疹；② 体温 38 ℃；③ 至少两个部位的淋巴结增大；④ 至少 1 个内脏器官受累；⑤ 至少伴有下列 1 项血液学改变：A. 淋巴细胞升高或降低；B. 嗜酸性粒细胞百分比或绝对计数升高；C. 血小板降低。符合 3 项或以上即可确诊。质子泵抑制剂目前均未见肺毒性相关报道。因此，多方面的结果印证了呋喃唑酮与间质性肺疾病的关系。

呋喃唑酮是硝基呋喃类抗菌药物，属于广谱抗菌药物，对多数革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑菌和杀菌作用，且其耐药率低，与其他类别的抗菌药物之间无交叉耐药性。呋喃唑酮常用于细菌性痢疾、肠炎等疾病的治疗，目前也被用作根除治疗幽门螺杆菌药物之一 [11]。荟萃分析发现呋喃唑酮与质子泵抑制剂、其他抗菌药物联用可以有效地增加幽门螺旋杆菌的清除率，同时呋喃唑酮相关的不良反应并未增加 [12]。郭燕等 [13] 分离 62 株幽门螺杆菌，均未发现呋喃唑酮耐药。本例患者出现全身乏力、高热、憋喘、腹泻，不良反应

表 2　呋喃唑酮引起间质性肺疾病的诺氏评估结果

相关问题	得分情况			
	是	否	未知	评分理由
1	＋1			已有呋喃唑酮引起间质性肺疾病的相关报道
2	＋2			间质性肺疾病是在使用呋喃唑酮后发生的
3	＋1			停药后症状缓解，即 ADR 有所缓解
4	＋2			再次服用呋喃唑酮后患者再次出现症状
5			0	是否存在其他原因能单独引起间质性肺疾病
6			0	该反应在应用安慰剂后未重复出现
7			0	未测定呋喃唑酮是否达到毒性浓度
8			0	该反应随呋喃唑酮剂量减少而缓解
9		0		未知该患者是否先前暴露于同类药物并出现过类似反应
10	＋1			患者血常规监测及胸部 CT 等可视为该反应的客观证据
总分值	7 分			

注：总分≥ 9 分为肯定；5 ～ 8 分为很可能；1 ～ 4 分为可能；≤ 0 分为可疑。

多且症状严重，可能与日剂量高、疗程长致呋喃唑酮体内蓄积中毒有关。检索文献发现，呋喃唑酮不良反应主要为恶心、呕吐、腹泻等消化道症状，可见哮喘、直立性低血压等，偶见溶血性贫血、多发性神经炎 [14]。呋喃唑酮引起的肺部并发症少见，分为急性反应和慢性反应，其中急性反应较多见，为常见的药物性肺损伤，慢性反应相对发生率低。根据本研究检索相关内容发现，呋喃唑酮导致的 DILD 病例数较少。已报道病例中，患者经短期口服激素治疗后均能痊愈，本例患者在对症支持治疗后也明显好转。

治疗 DILD，首先且最重要的是停药，其次做好对症支持治疗。激素治疗目前尚无统一意见，可根据患者临床症状及病情严重程度具体判断剂量和疗程。本例患者停用呋喃唑酮后加强支持治疗，未使用激素治疗，病情逐渐好转。而已报道病例中均为小剂量、短疗程激素治疗。对于呋喃唑酮导致的 DILD，激素剂量和疗程仍不明确，需在临床工作中进一步积累经验。

综上，呋喃唑酮导致的 DILD 发病率低，以发热、咳嗽和呼吸困难为主要表现。在应用呋喃唑酮的过程中，应加强监测患者的状况。但目前报道病例数较少，仍需要大型药物流行病学研究予以证实。呋喃唑酮作为根除幽门螺杆菌的补充治疗药物，在使用此类药物时需评估相关风险。

参考文献

[1] Spagnolo P，Bonniaud P，Rossi G，et al. Drug-induced interstitial lung disease [J]. Eur Respir J，2022，60（4）：2102776.

[2] Mudawi D，Heyes K，Hastings R，et al. An update on interstitial lung disease [J]. Br J Hosp Med（Lond），2021，82（7）：1-14.

[3] Cortez LM，Pankey GA. Acute pulmonary hypersensitivity to furazolidone [J]. Am Rev Respir Dis，1972，105（5）：823-826.

[4] Collins JV，Thomas AL. Pulmonary reaction to furoxone [J]. Postgrad Med J，1973，49（573）：518-520.

[5] Kowalski TJ，Henry MJ，Zlabek JA. Furazolidone-induced pulmonary hypersensitivity [J]. Ann Pharmacother，2005，39（2）：377-379.

[6] 王丽芳，肖永龙，施斌 . 急性嗜酸粒细胞性肺炎 2 例并文献复习 [J]. 国际呼吸杂志，2022，42（7）：545-551.

[7] Matsuno O. Drug-induced interstitial lung disease：mechanisms and best diagnostic approaches [J]. Respir Res，2012，13（1）：39.

[8] Cleverley JR，Screaton NJ，Hiorns MP，et al. Drug-induced lung disease：high-resolution CT and histological findings [J]. Clin Radiol，2002，57（4）：292-299.

[9] Inomata S，Takahashi H，Nagata M，et al. Acute lung injury as an adverse event of gefitinib [J]. Anticancer Drugs，2004，15（5）：461-467.

[10] Matsuno O，Ono E，Ueno T，et al. Increased serum ADAM8 concentration in patients with drug-induced eosinophilic pneumonia-ADAM8 expression depends on the allergen route of entry [J]. Respir Med，2010，104（1）：34-39.

[11] 胡奕，吕农华 . 规范应用呋喃唑酮根除幽门螺杆菌 [J]. 中华消化杂志，2021，41（9）：639-641.

[12] Zhuge L，Wang YH，Wu S，et al. Furazolidone treatment for helicobacter pylori infection：a systematic review and meta-analysis [J]. Helicobacter，2018，23（2）：e12468.

[13] 郭燕，郭勤，沈守荣 . 幽门螺杆菌的耐药分析及对 Hp 根除的影响 [J]. 中南药学，2005，3（5）：270-272.

[14] 赵娅，郭嘉荣，凌霄，等 . 呋喃唑酮所致药品不良反应的数据分析 [J]. 中国药物滥用防治杂志，2020，26（6）：353-356.

（收稿日期：2022-10-17；修回日期：2022-11-16）

1 例 PD-L1 抑制剂致突眼不良反应分析

周转利[1]，姚霜霜[2]，甄琴[2]，赵立[2]，谈仪炯[1*]，刘芳[2*]（1. 上海交通大学医学院附属第一人民医院临床药学科，上海 200080；2. 上海交通大学医学院附属第一人民医院内分泌代谢科，上海 200080）

关键词：PD-L1 抑制剂；突眼；不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)07-1976-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.07.047

细胞程序性死亡受体 -1（PD-1）分别为细胞程序性死亡 - 配体 1（PD-L1）和 2（PD-L2）。PD-L1 主要表达于抗原提呈细胞、活化的 T 细胞、非淋巴组织和某些肿瘤中，与免疫系统的抑制有关[1-2]。PD-1 与 PD-L1 结合，可以抑制 CD28 介导的 T 细胞活化、增殖、细胞因子的产生，并可能导致 T 细胞凋亡[3]。PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂的免疫治疗，一方面可以充分利用和调动肿瘤患者体内的特异性杀伤性 T 淋巴细胞，杀伤肿瘤，另一方面可通过逆转免疫耐受，增强肿瘤患者机体的长期免疫应答，并最终延长生存期，对晚期或转移性实体瘤或血液肿瘤患者来说是一种新的治疗方法[4]。研究显示，PD-1/PD-L1 抑制剂在临床已被广泛应用于乳腺癌、非小细胞肺癌、肾癌、膀胱癌、恶性黑色素瘤等多种恶性肿瘤的治疗并取得了较好的结果。但 PD-1/PD-L1 抑制剂阻断了人体内的免疫检查点，会引起体内免疫耐受的不平衡，引起免疫相关不良反应（irAEs）。irAEs 多发生在皮肤、内分泌系统、胃肠、肝脏、肺等器官，偶可累及心脏、神经系统，少有致死性事件发生[5]。度伐利尤单抗是临床常用的免疫靶向药物，作为 PD-L1 抑制剂，可以通过抑制 PD-L1 的作用促使 T 细胞攻击肿瘤细胞，有效阻断肿瘤免疫逃逸。相对于 PD-1 抑制剂，PD-L1 抑制剂不良反应更小，常见的有间质性肺炎、结肠炎、皮疹等。目前，国内 PD-L1 抑制剂致眼病不良反应报道罕见，本文通过 1 例应用 PD-L1 抑制剂后出现双侧突眼的病例分析，提高临床对该类不良反应诊治的认识。

1 病例资料

患者，女，71 岁，因胃痛伴吞咽困难于 2021 年 12 月于外院就诊，PET/CT 提示食管中下段管壁弥漫性增厚，胃体、胃窦壁增厚，考虑为恶性肿瘤 cTxNxM1 Ⅳ期。胃镜病理提示，食管下段低分化神经内分泌癌。免疫组化（E21-2612）A 片：CK20（细胞膜＋）、Ki-67（90% ＋）、Syn（＋）、CgA（＋）、CD5（＋）、TTF-1（－）、NF（＋）、CD117（＋）、GATA3（－）、SOX-10（－）、S-100（－）、CK7（核旁点状＋）、P63（＋）、P120（细胞膜＋）。B 片：CerbB-2（0）、MLH1（＋）、MSH2（＋）、MSH6（＋）、PMS2（＋）、PD-L1（5% ＋）。D 片：CK（pan）（＋）、LCA（－）。入院后予依托泊苷 130 mg（第 1 ～ 3 日）、顺铂 30 mg（第 1 日）联合度伐利尤单抗 1000 mg（第 1 日）静脉滴注治疗。用药 1 周后出现双眼突出肿胀，视物模糊，未予特殊处理。出院后突眼症状加重。2022 年 1 月 4 日因眼部症状加重再次外院住院治疗，查视力：右眼 0.3，左眼 0.5；眼压：右眼 18.7 mmHg（1 mmHg ＝ 133.2 Pa），左眼 19.7 mmHg；眼球突出度检查：右眼 19 mm↑，左眼 21 mm↑，眶距 101 mm。左眼黄斑中心凹反光消失。眼眶磁共振成像（MRI）：双眼球突出，双侧眼肌肌腹明显增粗，提示甲状腺相关眼病可能。查甲状腺功能：血清游离三碘甲腺原氨酸（FT3）3.87 pmol • L^{-1}，游离甲状腺素（FT4）15.6 pmol • L^{-1}，血清促甲状腺激素（TSH）0.635 μIU • mL^{-1}。促甲状腺激素受体抗体（TRAb）、甲状腺球蛋白抗体（TGAb）、甲状腺过氧化物酶抗体（TPOAb）均为阴性。予妥布霉素地塞米松眼膏、氧氟沙星滴眼液、小牛血清眼用凝胶外用对症处理后症状有所缓解。2022 年 1 月 16 日为进一步改善眼部症状收治我院内分泌代谢科。既往史：左乳恶性肿瘤术后 7 年余；高血压病史 10 余年，服用氯沙坦钾片 50 mg qd 控制，自诉血压控制可。过敏史：否认食物、药物过敏史。

体格检查：体温 36 ℃，心率 78 次 • min^{-1}，

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81770802）。
作者简介：周转利，女，博士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：zzlsh@foxmail.com *通信作者：谈仪炯，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：517933922@qq.com；刘芳，女，博士研究生导师，主任医师，教授，主要从事内分泌临床、科研和教学工作，email：f-liu@sjtu.edu.cn

呼吸 15 次 • min^{-1}，血压 144/67 mmHg。身高 165 cm，体质量 52 kg，体质量指数 19.1 $kg•m^{-2}$。恶病质状态，贫血貌，一般情况差。双侧甲状腺Ⅰ度肿大，质地软，结节感，无血管杂音。双侧眼球突出固定，球结膜增生、充血，翻出眼眶，伴水肿、流泪，眼睑无法闭合。双侧瞳孔等大等圆，瞳孔直径约 6 mm，双侧直接、间接对光反射消失。双侧视力无光感（见图 1）。

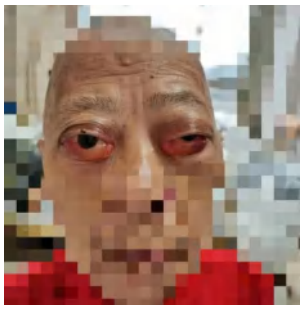


图 1　患者入院时双眼突出表现

入院后查甲状腺功能：FT3 4.05 pmol • L^{-1}，FT4 11.32 pmol • L^{-1}，TSH 1.14 μIU • mL^{-1}，甲状腺相关抗体均为阴性；眼眶发射型计算机断层显像（ECT）：双侧眼肌肌腹明显增粗，双眼球后区域及眼眶外侧份显像剂摄取增高，双侧眼球突出。眼眶 MRI 增强：双侧眼球突出，眼环显示清晰，眼球内信号均匀，未见异常信号，双眼眼外肌肌腹增粗，以内下直肌、上斜肌明显。球后肌锥内信号未见异常。视神经形态、信号未见异常（见图 2）。

图 2　眼眶 MRI

诊疗经过：入院后完善相关检查，予流质饮食，补液支持，奥美拉唑抑酸护胃。予螺内酯利尿，减轻局部水肿，氧氟沙星滴眼液、妥布霉素地塞米松眼膏、小牛血清眼用凝胶等眼部外用对症处理。后患者突眼进行性加重，眼科专家会诊后，予倍氯米松针眶内注射治疗 1 次，嘱出院眼科门诊定期进行球后糖皮质激素注射治疗，但患者消耗症状加重，出院 2 周后死亡。

2　讨论

2.1　关联性评价

自身免疫性眼病是一组机体对自身抗原产生免疫反应而导致眼表、眼内及眼眶周围组织受到损害的疾病。本病例中，患者在使用度伐利尤单抗第一次治疗后出现双眼突出肿胀，视物模糊。眼眶 MRI 符合“甲状腺相关性眼病”的放射学表现。但是，患者既往无 Graves 病及桥本甲状腺炎等病史，查甲状腺功能及 TPOAb、TGAb、TRAb 等自身抗体均正常，基本排除甲状腺相关性突眼。本例患者突眼出现在用药 1 周后，发生时间密切相关，考虑其突眼原因与该 PD-L1 抑制剂激活免疫反应引起的不良反应可能有关。使用诺氏（Naranjo’s）不良反应评估量表进行关联性评价，评分为 7 分，关联性为“很可能有关”，见表 1。

表 1　药物不良反应诺氏评估量表

相关问题	是	否	未知	评分
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	＋1
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	＋2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0
8. 该 ADR 是否随着剂量的增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现类似反应	＋1	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分				7

2.2　PD-1/PD-L1 抑制剂不良反应情况

随着 PD-1/PD-L1 抑制剂被广泛应用于临床，其导致的免疫相关不良反应越来越受到人们的关注。在 PD-1/PD-L1 抑制剂所致的不良事件中，疲劳、皮肤瘙痒、腹泻、红斑和恶心居前 5 位。此外，还会引起内分泌器官、肝脏、肺和心脏等特定器官的不良反应以及少部分罕见毒性反应 [6]。2021 年版《中国临床肿瘤协会（CSCO）免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南》推荐对 irAEs 实行分级处理原则。密切监测，酌情使用糖皮质激素治疗，甚至停用原免疫检查点抑制剂。在国内外指南、专家共识及药品说明书中未提及 PD-1/PD-L1 抑制剂导致突眼，仅有少量的个案报道 PD-1/PD-L1 抑制剂导致的自身免疫性眼病 [7-12]。

2.3　PD-1/PD-L1 抑制剂致突眼的机制

该患者诊断为食管下段低分化神经内分泌癌伴多发转移，自身免疫功能差。突眼症状出现前

有使用 PD-L1 抑制剂度伐利尤单抗的病史，目前眼眶 MRI 表现与甲亢突眼相似，甲状腺相关性眼病也是自身免疫性炎症，推断与 PD-L1 抑制剂引起的突眼机制相似。PD-L1 抑制剂通过阻断 PD-1/PD-L1 信号通路，解除了对 T 细胞免疫活性的抑制，促进效应 T 细胞的活化及增殖，发挥肿瘤免疫效应，杀死肿瘤细胞。但在治疗肿瘤的同时，正常外周组织中的 PD-1/PD-L1 信号通路同样被阻断，机体正常的免疫反应被增强，炎症反应被激活，进而产生大量白细胞介素（IL）-1β、干扰素和肿瘤坏死因子α（TNF-α）等促炎细胞因子，进一步诱导成纤维细胞的增殖和活化等[13]。此外，辅助性 T 细胞的活化会诱导炎症因子 IL-4、IL-10 等的释放，从而激活体液免疫应答参与眼眶周围组织的重塑和纤维化。这些原因均可能是 PD-L1 抑制剂致突眼的机制，但仍需进一步研究进行确证。

2.4 不良反应的处理

PD-L1 抑制剂致突眼的病例目前国内外报道较少，不易引起临床重视，但本病例提醒我们，突眼发展迅速、进行性加重，若不及时处理，短期内可导致视力丧失。建议在该类药物开始治疗前、使用过程中加强眼部表现的监测和眼眶影像检查，出现眼部相关不良事件的患者，尽快进行眼眶发射计算机断层显像（ECT）等检查确立诊断，及时给予曲安奈德球后注射或全身性糖皮质激素治疗。另外突眼的护理尤为重要。可将重组牛碱性成纤维细胞生长因子眼用凝胶涂于患处，再用金霉素眼膏涂抹。同时每日多次给予羧甲基纤维素钠滴眼液等人工泪液，保持角膜湿润。

3 小结

PD-1/PD-L1 通路的失活导致多种自身免疫性疾病的发生，包括系统性红斑狼疮、1 型糖尿病、多发性硬化等[14]。近 10 年来免疫检查点抑制剂的应用是肿瘤治疗中最重要的进展之一，但其在使用过程中出现的不良反应却不容忽视。其中与眼部相关的免疫不良事件较为罕见，所报道的眼部免疫不良事件发生率占总免疫不良事件发生率的比例不足 1%[15]。使用 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗的患者可能会出现动眼神经麻痹、干眼、葡萄膜炎、视神经炎等相关眼部不良事件[16]。且 PD-1/PD-L1 抑制剂引起的自身免疫性眼病病情较重、进展迅速，不及时处理可致盲，极大地影响患者的生存质量。因此需要临床及时识别，除了给予糖皮质激素治疗外，眼部的护理同样重要。尽管如此，现有治疗手段效果仍不理想。如何规避或减少使用免疫检查点抑制剂后眼部相关免疫不良事件的发生，值得进一步研究探讨。

参考文献

[1] 何红霞，范恒，杨佳 . PD-1/PD-L1 在自身免疫性疾病中作用的研究进展 [J]. 华中科技大学学报（医学版），2021，50（5）：664-668.

[2] Dermani FK，Samadi P，Rahmani G，et al. PD-L1/PD-L1 immune checkpoint：potential target for cancer therapy [J]. J Cell Physiol，2019，234（2）：1313-1325.

[3] 于长春，岳晓彤，张小雷，等 . PD-1/PD-L1 在肿瘤免疫治疗中的应用研究进展 [J]. 吉林师范大学学报（自然科学版），2022，43（3）：112-118.

[4] Boutros C，Tarhini AA，Routier E，et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-L1 antibodies alone and in combination [J]. Nat Rev Clin Oncol，2016，13（8）：473-486.

[5] Wang Y，Zhou S，Yang F，et al. Treatment-related adverse events of PD-1 and PD-L1 inhibitors in clinical trials：a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2019，5（7）：1008-1019.

[6] 林嘉莹，金冠钦，何庆烽，等 . PD-1/PD-L1 抑制剂免疫相关不良反应在临床试验中的应对策略 [J]. 中国临床药学杂志，2022，31（4）：315-320.

[7] Meng Q，Yang P，Guo H，et al. Characteristic expression of PD-L1 and its ligands mRNAs in patients with noninfectious uveitis [J]. Int J Clin Exp Med，2016，9（1）：323-329.

[8] Meng Q，Liu X，Yang P，et al. PDCD1 genes may protect against extraocular manifestations in Chinese Han patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome [J]. Mol Vis，2009，15：386-392.

[9] Li Y，Hong M，Huang X，et al. PD-1 Polymorphisms are associated with susceptibility of acute anterior uveitis in Chinese population [J]. DNA Cell Biol，2019，38（2）：121-128.

[10] 夏晓玲，汤玮，孙亮亮，等 . 甲状腺相关性眼病患者外周血 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞百分比及细胞表面程序性死亡蛋白 1 表达的改变及其意义 [J]. 第二军医大学学报，2016，37（6）：704-710.

[11] El Annan J，Goyal S，Zhang Q，et al. Regulation of T-cell chemotaxis by programmed death-ligand 1（PD-L1）in dry eye-associated corneal inflammation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2010，51（7）：3418-3423.

[12] Kobayashi M，Kawano S，Hatachi S，et al. Enhanced expression of programmed death-1（PD-L1）/PD-L1 in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome [J]. J Rheumatol，2005，32（11）：2156-2163.

[13] Łacheta D，Miśkiewicz P，Głuszko A，et al. Immunological aspects of Graves' ophthalmopathy [J]. Biomed Res Int，2019，2019：7453260.

[14] Dai S，Jia R，Zhang X，et al. The PD-L1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases [J]. Cell Immunol，2014，290（1）：72-79.

[15] Antoun J，Titah C，Cochereau I. Ocular and orbital side-effects of checkpoint inhibitors [J]. Curr Opin Oncol，2016，28（4）：288-294.

[16] Dalvin LA，Shields CL，Orloff M，et al. Checkpoint inhibitor immune therapy：systemic indications and ophthalmic side effects [J]. Retina，2018，38（6）：1063-1078.

（收稿日期：2022-10-26；修回日期：2022-12-31）